



**HAL**  
open science

# Mise en évidence d'une fonction non-transcriptionnelle du facteur de transcription homéotique Cdx2

Christine Soret

► **To cite this version:**

Christine Soret. Mise en évidence d'une fonction non-transcriptionnelle du facteur de transcription homéotique Cdx2. Génomique, Transcriptomique et Protéomique [q-bio.GN]. Université de Strasbourg, 2014. Français. NNT : 2014STRAJ109 . tel-01237274

**HAL Id: tel-01237274**

**<https://theses.hal.science/tel-01237274>**

Submitted on 3 Dec 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.

*ÉCOLE DOCTORALE 414 : VIE ET SANTE*

INSERM U1113

**THÈSE** présentée par :

**Christine SORET**

soutenue le : **18 septembre 2014**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**  
Discipline/ Spécialité : Aspects cellulaires et moléculaires de la biologie

**Mise en évidence d'une fonction non-  
transcriptionnelle du facteur de transcription  
homéotique Cdx2**

**THÈSE dirigée par :**

**Mme DOMON-DELL Claire**

CR-HDR, université de Strasbourg

**RAPPORTEURS :**

**Mme PLATEROTI Michelina**

DR, UMR-5534, Lyon

**M BILLAUD Marc**

DR, CNRS, Grenoble

**EXAMINATEUR :**

**Mme DANTZER Françoise**

DR, CNRS, université de Strasbourg

---

**AUTRES MEMBRES DU JURY :**

**M FREUND Jean-Noël**

**(co-directeur de thèse)**

DR, INSERM U1113, université de Strasbourg

## Remerciements

Je tiens, dans un premier temps, à remercier Françoise Dantzer, Michelina Plateroti ainsi que Marc Billaud pour avoir bien voulu être les rapporteurs et examinateur de mon travail de thèse. Je remercie également le ministère de l'enseignement et de la recherche ainsi que la Fondation pour la Recherche Médicale pour avoir financé mes années de thèse.

Ensuite, car bien trop timide et trop peu expressive, je tiens à profiter de cette page blanche qui m'est offerte pour m'exprimer et remercier toutes les personnes qui ont été des membres importants de mon aventure « thèse ».

Tout d'abord, je remercie, de manière générale, l'ensemble de l'équipe « JNF » et plus particulièrement le « poulailler » (Annick, Claire, Elisabeth, Isa D, Isa Gi, Isa Gr, Léonor, Marie, Véro) qui forment un groupe chaleureux et accueillant offrant un cadre de travail idéal avec un soutien logistique, technique, scientifique et administratif ; quand on a un souci, il y a toujours, au moins, une personne pour nous aider !

Je remercie également tous les compagnons d'aventures, notamment ceux qui m'ont marquée d'une manière ou d'une autre. Les anciens : Benjamin, l'initiateur ; Isa H et Thoueiba, les grandes sœurs ; Tristan, et ses supers soirées ; Laura, Céline, Inès et Anja : les ex-compagnons de bureau ; Mathilde, mon binôme. Et les plus récents : Camille, Cynthia, Marie-Elodie, Pierre, Yannick...

Et plus particulièrement :

A Elisabeth, notre Maman Poule aux doigts de fée, qui a été d'une aide précieuse au quotidien et toujours dans la bonne humeur. J'ai toujours pu compter sur toi que ce soit pour des petits conseils, du matériel, des cellules, des immunos, ... même quand j'oublie de te noter les détails de ma commande ou avec ce fichu Hoxb7 qui t'a donné des « lames à retordre ». Merci pour les 10<sup>j'ose même pas imaginer</sup> cellules que tu m'as préparées au cours de ces 4 ans ½, et mille mercis pour tout le reste, ce que tu accomplis pour nous tous au quotidien.

A Isa G, merci pour tout, que ce soit pour les commandes, les produits, pour m'avoir aidée sur mes problèmes techniques, m'en avoir appris de nouvelles ou pour m'avoir fait partager certaines de tes expériences et pour m'avoir encouragée et donnée confiance en moi.

A Isa D, merci pour la « vie de bureau » et ton aide très précieuse avec les souris.

A Marie, mon ancienne voisine de paillasse : travailler en face de toi était un réel plaisir, non seulement parce qu'on partageait pipette, tippex et émission de radio mais aussi et surtout parce que ta joie de vivre et ton sourire au quotidien étaient vraiment plaisant, sans oublier que j'ai toujours pu compter sur toi, ton aide et ton expérience. Je te remercie pour tout.

A Thoue et Isa H, les deux « grandes » de l'équipe à mon arrivée. Vous avez été mes « guides » sur la vie de labo, et partager le déjeuner avec vous était un plaisir. Thoue, j'ai en plus eu la chance d'être avec toi dans le bureau avec tout ce que ça implique, surtout les fous rires. J'ai pu compter sur ton aide et tes conseils encore jusqu'à aujourd'hui. Merci pour ton « pétillantisme », ton soutien et ton amitié. Et : I feel good, Ta nana nana nana nana, so good, toum toum so good...! 🎵

A Mathilde, un grand merci pour tous ces bons souvenirs, les jours fériés fofous au labo, nos petits délires, George et Richard, et j'en passe... Cette dernière année n'a pas été très facile autant pour toi que pour moi, mais je n'en oublie pas pour autant tous les bons moments qu'on a passés ensemble au labo et en dehors, et qui n'auraient sans doute pas été pareils sans toi. Je te souhaite bon courage pour ta 4<sup>ème</sup> année, je te souhaite que tu finisses en beauté avec beaucoup de bonheur et de réussite. Merci Poulette !

A mes fidèles compagnons de ce long parcours universitaire, de la licence à la soutenance, avec qui les moments passés sur les bancs de la fac resteront d'excellents souvenirs et sur qui je peux toujours compter : Mélanie et Yara.

Enfin, je remercie vivement les deux personnes sans lesquelles cette aventure n'aurait pas eu lieu, mes co-directeurs de thèse, Claire et Jean-Noël.

A Claire, merci de m'avoir pris en tant qu'étudiante M2, de m'avoir transmis les bases techniques ainsi que les moyens de poursuivre en thèse. Tu as très bien réussi à cerner ma personnalité et tu as toujours trouvé les bons mots pour m'encourager et me soutenir, d'un point de vue professionnel mais pas que, tu m'as toujours prêté une oreille attentive même dans les moments difficiles. Merci pour ta gentillesse et ta patience, pour m'avoir fait confiance et laissé mener ce projet. Avec les expériences qu'on a vécues ensemble ou chacune de notre côté, au cours de cette thèse j'ai appris beaucoup et la leçon que je retiendrai le plus de toi c'est que quand on a un rêve, il n'est jamais trop tard pour essayer de le concrétiser. J'espère que ta première expérience en tant que directrice de thèse te laissera de bons souvenirs et je te souhaite de pouvoir réaliser, par un moyen ou un autre, au moins un petit bout de ton rêve. Merci pour tout.

A Jean-Noël, merci pour m'avoir accueillie au sein de ton équipe et de m'avoir fait confiance. J'ai toujours pu compter sur toi, ton aide, ta disponibilité et ta rapidité. J'ai vraiment apprécié pouvoir venir te voir pour discuter de mes résultats ; combien de fois je suis rentrée dans ton bureau, dépitée par des résultats inattendus ou inexplicables, et que j'en suis ressortie plus motivée que jamais car tu avais su y trouver une logique et les rendre intéressants. Ton engouement pour les nouveaux résultats et la science a, pour moi, toujours été communicatif. Merci pour tout.

Encore un petit mot pour remercier mes parents et mes sœurs Delphine et Corinne (sans oublier Jérémie et Margaux), qui ont été d'un soutien inconditionnel dans les bons comme dans les mauvais moments. Merci de croire en moi, de me faire confiance et de me laisser réaliser mes rêves et même si parfois c'est avec un peu d'appréhension, de me soutenir dans leur réalisation. Cette thèse est en grande partie pour vous. Un grand merci à vous, pour ce que vous faites pour moi et pour être simplement là. Je vous aime fort.

Merci à tous,

Christine

*« L'impossible n'existe que parce que nous n'essayons pas de le rendre possible »*

Mike Horn

## Résumé

Les gènes homéotiques sont des éléments indispensables du développement embryonnaire. Chez l'adulte, ils participent au maintien et à l'homéostasie du tissu dans lequel ils sont exprimés. Le principal mode d'action des protéines à homéodomaine est d'activer la transcription de leurs gènes cibles via une interaction avec l'ADN. Cependant, de plus en plus de travaux révèlent de nouvelles fonctions non-transcriptionnelles de ces protéines.

Les gènes homéotiques sont souvent dérégulés dans bon nombre de pathologies, telles que les cancers. Une réduction de leur expression est souvent associée à une fonction de suppresseur de tumeur alors qu'une surexpression corrèle avec un rôle oncogénique. Certains gènes homéotiques peuvent endosser, à la fois, le rôle de suppresseur de tumeur et celui d'oncogène dans des contextes cellulaires différents.

L'objectif de mon travail de thèse a été de comprendre la dualité de fonction pour *Cdx2*, un gène homéotique exprimé normalement et spécifiquement au niveau de l'épithélium intestinal et important dans l'homéostasie du tube digestif. En effet, son expression est réduite dans le développement des cancers colorectaux, il y agit comme suppresseur de tumeur. A l'inverse, une expression ectopique est observée dans des cas pathologiques tels que les leucémies aigües où il favorise le développement tumoral ; *Cdx2* s'y comporte comme oncogène.

Notre hypothèse permettant d'expliquer cette dualité de fonctions est que CDX2 interagit avec des partenaires protéiques d'une des deux lignées cellulaires.

Dans la première partie de ma thèse, nous avons ainsi pu mettre en évidence une interaction entre CDX2 et deux partenaires protéiques, spécifiquement dans la lignée intestinale mais pas dans les leucémies. Ces partenaires sont les protéines KU70 et KU80, deux membres du système de réparation de l'ADN NHEJ. De cette interaction en résulte la découverte d'une nouvelle fonction non transcriptionnelle de CDX2 dans la réparation de l'ADN. En effet, CDX2 exerce une fonction inhibitrice sur la réparation via son interaction avec KU70/80 conduisant à une baisse de la survie cellulaire après un stress génotoxique.

La deuxième partie de ma thèse a visé à mieux comprendre le mécanisme de cette nouvelle fonction de CDX2. Pour cela, nous avons comparé les effets de CDX2 et HOXB7 sur le NHEJ. HOXB7 est une protéine à homéodomaine qui interagit également avec KU70/80 mais qui à l'inverse de CDX2, stimule le NHEJ. *Hoxb7* est surexprimé dans les cancers colorectaux et est associé à un mauvais pronostic. En utilisant différents mutants de délétion et chimériques, nous avons montré que contrairement à CDX2, HOXB7 nécessite son domaine de transactivation pour son activité sur la réparation. De plus, nous avons identifié une interaction de CDX2 avec HOXB7 qui empêche la fixation de ce dernier sur ses cibles et donc sa fonction transcriptionnelle.

Mon travail de thèse a donc permis d'une part de mettre en évidence une nouvelle fonction non transcriptionnelle de CDX2 dans la réparation de l'ADN par le NHEJ et d'autre part, illustre comment deux protéines appartenant à une même famille peuvent avoir deux rôles opposés dans une même fonction au travers de mécanismes différents.

**Mots clés :** CDX2, HOXB7, cancer colorectal, NHEJ, suppresseur de tumeur, oncogène.

## ***Abstract***

Homeobox genes are key elements of the embryonic development. In adulthood they participate to the homeostasis of tissues where they are expressed. The first way to act for homeodomain proteins is by activating the transcription of their target genes through direct DNA binding; however more and more studies reveal new non-transcriptional activities of these proteins.

Homeobox genes are deregulated in a lot of pathologies like cancer in which their expression can be down- or up-regulated. A down-regulation is often associated with a tumor suppressor function whereas an up-regulation often relates with an oncogenic role. Some homeobox genes can be at the same time oncogene and tumor suppressor but in two different cellular contexts.

The aim of my thesis was to explore the dual function of *Cdx2*, an important gene in bowel homeostasis, and the underlying mechanism. Indeed the physiological expression of *Cdx2* in the intestinal epithelium becomes reduced and heterogeneous in colorectal cancers. In this tissue *Cdx2* has a tumor suppressor function. In contrary an ectopic expression of *Cdx2* is observed in pathologic situations like acute leukemia in which it stimulates tumor development by playing the role of an oncogene.

Our hypothesis to explain these two opposite effects is that the CDX2 protein could differently interact with protein partners in the two tissues.

In the first part of this work, we have shown that CDX2 indeed interacts with two partners in colorectal cancer cells but not in leukemia cells. These partners are KU70 and KU80, two members of the NHEJ DNA repair system. Through this interaction we discover a new non-transcriptional function of CDX2 in DNA repair. Indeed CDX2 inhibits NHEJ through its interaction with KU70/80 leading to a decrease of colorectal cancer cells survival after a genotoxic stress.

The second goal of my work was to better understand the mechanism of this new function of CDX2. For this purpose, we have compared the effects of CDX2 and HOXB7 on DNA repair. HOXB7 is also a homeodomain protein that has been shown to interact with KU70/80 but in contrary to CDX2 it stimulates NHEJ and plays an oncogenic role in mammary cancer. *Hoxb7* is overexpressed in colorectal cancer and associated with a poor prognosis. Using a combination of truncated and hybrid proteins, we demonstrated that CDX2 and HOXB7 used different mechanisms to control DNA repair and these involve different domains of the HOXB7 and CDX2 proteins. Moreover, we identified a new mechanism of action of CDX2 that interacts with HOXB7 and prevent its binding to DNA targets on the chromatin and thus its transcriptional effects.

This work leads to the discovery of a new non-transcriptional function of CDX2 in DNA repair by NHEJ and illustrate how two proteins belonging to the same family can play opposite role through different mechanisms.

**Key words:** CDX2, HOXB7, colorectal cancer, NHEJ, tumor suppressor, oncogene.

# Sommaire

<b>INTRODUCTION</b> .....	1
<b>Chapitre I : Les gènes homéotiques</b> .....	2
1. Définition .....	2
A. Définition génétique .....	2
B. Définition moléculaire .....	3
C. Phylogénie .....	5
2. Les gènes homéotiques dans le développement .....	7
3. Les gènes homéotiques chez l'adulte .....	8
4. Les gènes homéotiques et les pathologies chez l'Homme .....	9
A. Les malformations .....	9
B. Les cancers .....	10
<b>Chapitre II : Cdx2 et Hoxb7, deux gènes impliqués dans la cancérogenèse colique</b> .....	12
1. Le système digestif .....	12
A. L'organogenèse du tube digestif .....	12
B. Le tube digestif adulte .....	14
C. Le cancer colorectal .....	16
a. Classification .....	16
b. Traitement .....	17
c. Développement du cancer .....	18
d. Aspects génétiques .....	19
e. Les cellules souches cancéreuses .....	20
2. Les gènes Cdx .....	21
A. Cdx1 .....	21
B. Cdx4 .....	22
C. Cdx2 .....	23
a. CDX2, une protéine à homéodomaine .....	23
b. Cdx2 dans l'embryogenèse .....	23
c. Cdx2 chez l'adulte sain .....	24
d. Fonctions moléculaires de CDX2 .....	26
i. Fonctions transcriptionnelles .....	26
ii. Fonctions non-transcriptionnelles .....	27
e. Fonctions cellulaires de CDX2 .....	28
i. CDX2 et prolifération cellulaire .....	28
ii. CDX2 et différenciation intestinale .....	29
iii. CDX2 et adhésion .....	30
iv. CDX2 et survie cellulaire .....	31
f. CDX2 dans les pathologies .....	31
i. Cdx2, un suppresseur de tumeur dans le cancer colorectal .....	31

➤ <i>Cdx2</i> et CCR .....	31
➤ <i>Cdx2</i> un suppresseur de tumeur .....	32
ii. <i>Cdx2</i> et maladies inflammatoires de l'intestin .....	34
iii. <i>Cdx2</i> et métaplasies intestinales .....	34
iv. <i>Cdx2</i> , un oncogène dans les leucémies aiguës .....	35
➤ <i>Cdx2</i> dans les leucémies aiguës .....	35
➤ <i>Cdx2</i> un oncogène .....	36
g. Dualité de fonction de CDX2 .....	37
h. Régulation de l'expression de l'activité de <i>Cdx2</i> .....	39
i. Régulation transcriptionnelle du gène <i>Cdx2</i> .....	39
ii. Régulation post-transcriptionnelle du gène <i>Cdx2</i> .....	41
iii. Régulation post-traductionnelle de CDX2 .....	41
iv. Régulation de l'activité de CDX2 .....	42
3. Le gène <i>Hoxb7</i> .....	42
A. <i>Hoxb7</i> et son expression normale .....	42
B. <i>Hoxb7</i> et cancer .....	43
C. HOXB7 et le C-NHEJ .....	44
<b>Chapitre III : La réparation de l'ADN</b> .....	<b>45</b>
1. Les voies de réparation « fidèles » .....	46
A. BER .....	46
a. Le mécanisme du BER : réparation d'une base endommagée .....	46
b. Les maladies associées au BER .....	46
B. NER .....	47
a. Le mécanisme du NER : réparation des dommages induits par les UVs .....	47
b. Les maladies associées au NER .....	48
C. MMR .....	48
a. Le mécanisme du MMR : réparation des mésappariements et délétion/insertions .....	48
b. Les maladies associées au MMR .....	49
D. La recombinaison homologue .....	49
a. Le mécanisme du HR : réparation des cassures double-brins d'ADN et des ponts inter-brins .....	49
b. Les maladies associées au HR .....	50
2. Les voies de réparation « infidèles » .....	51
A. Le SSA : réparation des cassures de l'ADN .....	51
B. Le NHEJ .....	51
a. Le mécanisme du NHEJ : réparation des cassures double-brins de l'ADN .....	52
i. Le NHEJ classique (C-NHEJ) .....	52
ii. Le Backup-NHEJ (B-NHEJ) ou NHEJ alternatif (A-NHEJ) .....	53
b. Les grands acteurs et leurs fonctions .....	54
i. KU70/80 .....	54
➤ NHEJ .....	55
➤ V(D)J .....	56



➤ Apoptose .....	56
➤ Télomères .....	57
ii. DNA-PKcs .....	57
iii. PARP1 et ADP-ribosylation .....	59
➤ Fonctions de PARP1 et de l'ADP-ribosylation .....	59
➤ Inhibiteurs de PARP et cancer .....	61
c. Les maladies associées au NHEJ .....	61
<b>OBJECTIFS</b> .....	64
<b>RESULTATS</b> .....	66
<b>Chapitre I : La dualité de Cdx2</b> .....	67
1. Cdx2, un gène, deux fonctions opposées, hypothèse .....	67
2. CDX2 inhibe le NHEJ dans les CCR et pas dans les leucémies .....	67
3. Conclusion .....	70
<b>Chapitre II : Les gènes homéotiques et le C-NHEJ</b> .....	71
1. Hoxb7, un autre gène homéotique impliqué dans le C-NHEJ .....	71
2. CDX2 et HOXB7, deux homéoprotéines aux fonctions opposées .....	71
3. Profils d'expression des gènes Cdx2 et Hoxb7 .....	74
4. Mécanismes de régulation potentiels de l'activité de réparation de CDX2 et HOXB7 .....	74
A. L'homéodomaine et ses sites de fixations à l'ADN .....	74
B. Modification post-traductionnelles et effets sur la réparation .....	76
a. Les phosphorylations .....	76
b. L'ADP-ribosylation .....	77
C. L'héxapeptide .....	78
D. Les mutants chimériques .....	79
5. Conclusion .....	81
<b>Chapitre III : Le variant d'épissage de Cdx2 : miniCdx2</b> .....	83
1. Le variant d'épissage miniCdx2 .....	83
2. Le rôle de miniCdx2 .....	83
3. Conclusion .....	85
<b>CONCLUSIONS ET DISCUSSION</b> .....	86
1. Une nouvelle fonction non-transcriptionnelle de CDX2 .....	87
2. Cdx2, un suppresseur de tumeur dans le côlon .....	88
3. Cdx2, un « lineage-survivaloncogene » .....	89
4. Cdx2, un oncogène .....	91
A. Les partenaires de CDX2 dans les cellules leucémiques .....	91
B. Perte d'interaction entre CDX2 et KU70/80 dans les cellules leucémiques .....	91

C. Modèles murins de perte/gain de fonction de <i>Cdx2</i> dans la lignée Hématopoïétique .....	92
5. CDX2, un régulateur du NHEJ .....	93
A. Des facteurs de transcription régulateurs du NHEJ .....	93
B. Interaction directe de CDX2 avec les protéines KU ? .....	94
C. CDX2 et les autres mécanismes de réparation de l'ADN .....	94
6. CDX2, HOXB7 et PBX .....	96
<b>MATERIELS ET METHODES</b> .....	97
<b><u>Chapitre I : Matériels</u></b> .....	98
1. Anticorps .....	98
2. Plasmides .....	98
3. Oligonucléotides .....	99
<b><u>Chapitre II : Méthodes</u></b> .....	100
1. Analyses de la réparation de l'ADN .....	100
A. La réparation de l'ADN in vivo .....	100
a. Analyse par FACS .....	100
b. Analyse par luciférase .....	101
B. La réparation de l'ADN in vitro .....	102
a. Extraction nucléaire .....	103
b. Test de réparation .....	103
2. Immunoprécipitation de la Chromatine (ChIP) .....	104
3. Clonages .....	105
A. Les mutants de délétion .....	105
B. Les mutants ponctuels .....	106
C. Les mutants chimériques .....	106
D. Les mutants de phosphorylation .....	107
E. Les mutants de l'héxapeptide .....	107
4. Analyses statistiques .....	108
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	109
<b>PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS</b> .....	129

## INTRODUCTION

### **Chapitre I : Les gènes homéotiques**

**Figure 1** : Colinéarité spatiale de l'expression des gènes Hox.

**Figure 2** : Structure de l'homéodomaine.

**Figure 3** : Complexe homéodomaine-ADN.

**Figure 4** : Evolution des clusters de gènes *Hox*.

**Figure 5** : Schéma d'évolution du génome selon Ohno et Holland.

**Figure 6** : Classification des gènes de la classe des gènes à homéobox.

**Figure 7** : Expression des gènes *Hox* chez l'adulte.

**Figure 8** : Rôles des protéines HOX sur la réplication de l'ADN.

**Figure 9** : Synpolydactylie.

**Figure 10** : Relation entre l'expression des gènes *Hox*, le développement de l'épithélium et la carcinogenèse.

### **Chapitre II : *Cdx2* et *Hoxb7*, deux gènes impliqués dans la cancérogenèse colique**

**Figure 11** : Représentation schématique du développement embryonnaire.

**Figure 12** : Régionalisation de l'endoderme intestinal.

**Figure 13** : Représentation des différentes couches du tube digestif.

**Figure 14** : Les cellules de l'épithélium intestinal.

**Figure 15** : Structure de l'épithélium intestinal.

**Figure 16** : Différents stades d'évolution d'un carcinome.

**Figure 17** : Modèle de Fearon et Vogelstein.

**Figure 18** : Schéma de la protéine CDX2

**Figure 19** : Implication de *Cdx2* dans le développement du squelette.

**Figure 20** : Expression de *Cdx2* chez l'adulte sain.

**Figure 21** : Mode d'action de CDX2 sur la voie Wnt.

**Figure 22** : CDX2 réduit la survie des patients atteints d'un CCR.

**Figure 23** : Expression de *Cdx2* dans un adénocarcinome.

**Figure 24** : Les souris *Cdx2*<sup>+/-</sup> sont plus sensibles au développement tumoral.

**Figure 25** : La perte de *Cdx2* engendre des anomalies chromosomiques en anaphase.

**Figure 26** : Expression de *Cdx2* dans les leucémies myéloïdes aigües.

**Figure 27** : CDX2 réduit la survie des patients atteints de leucémie aigüe.

**Figure 28** : Dérégulation des gènes *Hox* par CDX2.

**Figure 29** : Régulation des gènes *Hox* dans les leucémies aigües.

### **Chapitre IV : La réparation de l'ADN**

**Figure 30** : Mécanisme du BER.

**Figure 31** : Mécanisme de réparation NER.

**Figure 32** : Mécanisme du MMR.

**Figure 33** : Mécanismes de réparation des cassures de l'ADN.

**Figure 34** : Mécanisme du SSA.

**Figure 35** : Mécanisme du NHEJ classique.

**Figure 36** : Régulation des deux mécanismes du NHEJ.

**Figure 37** : Mécanisme du NHEJ alternatif.

**Figure 38** : Structure du complexe KU-ADN.

**Figure 39** : Mécanisme de génération des immunoglobulines.

**Figure 40** : Régulation de l'apoptose par KU70.

**Figure 41** : Schéma d'un télomère.

**Figure 42** : PARP et poly(ADP-ribose).

**Figure 43** : Le niveau de dommage dans l'ADN influence le devenir de la cellule.

## RESULTATS

### Chapitre II : Les gènes homéotiques et le C-NHEJ

**Figure 44** : Profil d'expression de *Cdx2* et *Hoxb7*.

**Figure 45** : La mutation de l'arginine 237 de CDX2.

**Figure 46** : La mutation de l'arginine 189 de HOXB7.

**Figure 47** : Rôle de la phosphorylation de CDX2 sur la réparation de l'ADN.

**Figure 48** : ADP-ribosylation de CDX2 et HOXB7.

**Figure 49** : Impact de l'ADP-ribosylation sur l'activité de réparation de CDX2 et HOXB7.

**Figure 50** : Rôle du domaine d'interaction avec PBX de CDX2 et HOXB7 sur la réparation de l'ADN.

**Figure 51** : Les mutants chimériques de CDX2 et HOXB7.

## MATERIELS ET METHODES

### Chapitre II : Méthodes

**Figure 52** : Système de rapporteur de l'activité de réparation des cassures de l'ADN.

**Figure 53** : Mutants de délétion.

**Figure 54** : Mutants ponctuels.

**Figure 55** : Mutants chimériques.

**Figure 56** : Mutants de phosphorylation.

**Figure 57** : Mutants de l'héxapeptide.

## ***Abréviations***

**ADP** : Adenosine Diphosphate  
**Apc** : Adenomatous Polyposis Coli  
**ARNm** : Acide Ribonucléique messenger  
**ATP** : Adénosine Triphosphate  
**AVC** : Accident Vasculaire Cérébral  
**Bcd** : Bicoïd  
**BER** : Base Excision Repair  
**BIR** : Break-Induced Replication  
**BMP** : Bone Morphogenetic Protein  
**Cad** : Caudal  
**CCR** : Cancer ColoRectal  
**CDK2** : Cyclin-Dependent Kinase 2  
**CDX** : Caudal Homeobox  
**ChIP** : Chromatine ImmunoPrecipitation  
**CIM** : CpG-Island Methylation  
**CIN** : Chromosome Instability  
**CSC** : Cellule Souche Cancéreuse  
**Ct** : Carboxy-terminale  
**dHJ** : Double Holliday Junction  
**D-loop** : Displacement Loop  
**DNA-PKcs** : DNA-Dependent Protein Kinase Catalytic Subunit  
**DSS** : Dextran Sodium Sulfate  
**E3,5** : jour Embryonnaire 3,5  
**EGF(R)** : Epidermal Growth Factor (Receptor)  
**EMT** : Transition Epithélio-Mésenchymateuse  
**FAP** : Familial Adenomatous Polyposis  
**FGF** : Fibroblast Growth Factor  
**FRET** : Fluorescence Resonance Energy Transfert  
**GFP** : Green Fluorescent Protein  
**HD** : Homéodomaine  
**Hexa** : Héxapeptide  
**HFGS** : Hand-Foot-Genital Syndrome  
**HNPCC** : Hereditary Non Polyposis Colorectal Cancer  
**HR** : Homologous Recombination  
**hTERT** : Human Telomerase Reverse Transcriptase  
**Kb** : Kilo Base  
**KDa** : Kilo Dalton  
**LI-cadhérine** : Liver Intestine Cadherin  
**M** : méthionine  
**miARN** : micro ARN  
**MIN** : Microsatellite Instability  
**NAD** : Nicotinamide Adenine Dinucleotide  
**NER (TC-, GG-)** : Nucleotide Excision Repair (Transcription-Coupled, Global-Genome)  
**NHEJ** : Non-Homologous End Joining  
**NK** : Natural Killer  
**P** : Proline  
**p.c.** : Post-coïtum

**PAR** : Poly-ADP Ribose  
**PARP** : Poly(ADP-ribose) Polymérase  
**PLA** : Proximity Ligation Assay  
**R** : Arginine  
**RFP** : Red Fluorescent Protein  
**RT-PCR** : Real Time-Polymerase Chain Reaction  
**S** : Sérine  
**SDSA** : Synthesis-Dependent Strand Annealing  
**SI** : Saccharase Isomaltase  
**SSA** : Single-Strand Annealing  
**TAD** : TransActivation Domain  
**TALE** : Three Amino Acid Loop Extension  
**TNF** : Tumor Necrosis Factor  
**TRF** : Telomeric Repeat binding Factor  
**UV** : Ultra Violet  
**V(D)J** : Variable Diversité Jonction  
**VEGF** : Vascular Endothelial Growth Factor  
**W** : Tryptophane

# INTRODUCTION

---

# Chapitre I : Les gènes homéotiques

## 1. Définition

### A. Définition génétique

Les gènes homéotiques représentent une grande famille de gènes. Leur rôle principal est observé chez l'embryon où ils interviennent dans la mise en place du plan d'organisation d'un être vivant. De ce fait, ils sont également appelés « **gènes architectes** ».

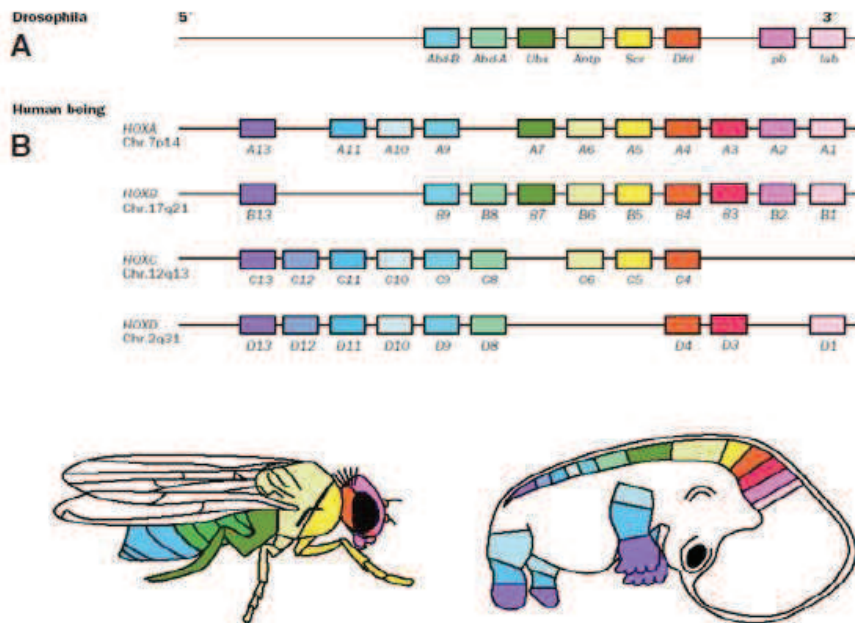
Lorsque la mutation d'un gène homéotique survient au cours du développement embryonnaire, elle conduit au remplacement d'un organe ou d'un segment par un autre ; ce changement est appelé une **homéose**.

La drosophile a été un outil très utilisé pour comprendre le développement d'un être vivant ainsi que le fonctionnement des gènes homéotiques.

Le développement de la drosophile commence par des divisions nucléaires, non suivies de division cytoplasmique, conduisant à la formation d'un syncytium. Les premiers noyaux à s'individualiser en tant que cellules apparaissent à un des pôles définissant ainsi le pôle postérieur. L'information de différenciation des cellules, en fonction de leur position, se fait par l'intermédiaire d'ARN messagers (ARNm) maternels qui diffusent dans l'œuf pour mettre en place l'axe antéro-postérieur. Le gène *Bicoïd* (*Bcd*) intervient dans l'antériorisation de l'embryon ; il forme un gradient décroissant de la partie antérieure vers la partie postérieure du syncytium. A l'inverse, au pôle postérieur c'est la protéine *Caudal* (*Cad*) qui est exprimée.

L'embryon se divise ensuite en six segments qui formeront la tête, trois pour le thorax et dix pour l'abdomen, grâce à des gènes de segmentation, tels que les gènes *Gap* ou *Pair-rule*, et aux gènes homéotiques qui leur donneront une information de position et une identité. C'est une combinaison, bien précise, de différents gènes homéotiques qui donne l'identité aux différents segments. Par exemple, les gènes du complexe *Bithorax* sont responsables de la formation du thorax postérieur et de l'abdomen. Le complexe *Antennapedia*, quant à lui, entraîne la formation de la tête et du thorax antérieur (Gehring, 1987).





**Figure 1. Collinéarité spatiale de l'expression des gènes *Hox*.**

Localisation chromosomique des gènes *Hox* chez la drosophile (A) et chez l'embryon humain (B) et leur expression relative le long de l'axe antéro-postérieur (Durston et al., 2011).

La fonction des gènes homéotiques a été découverte par l'étude de mutants, notamment chez la drosophile. La mutation du gène *Antennapedia*, dans le modèle de drosophile, a pour conséquence la perte de l'expression du gène de détermination du segment qui porte les antennes, entraînant son changement en un segment de type patte. Toujours chez la drosophile, la mutation du gène *Ultrabithorax* entraîne la différenciation du troisième segment en segment de type second segment thoracique : la drosophile possède alors, entre autre, une paire d'ailes en plus. Ceci est le phénomène **d'antériorisation**.

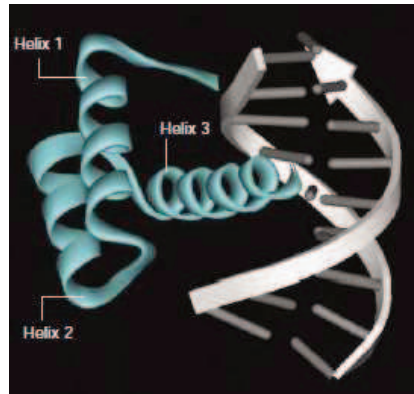
Les gènes homéotiques sont regroupés en **cluster**, c'est-à-dire qu'ils sont localisés les uns à la suite des autres sur un même chromosome. Chez les invertébrés, il existe un seul cluster sur un chromosome. Au cours de l'évolution et de la duplication du génome, ce cluster de gènes homéotiques s'est dupliqué. Chez les vertébrés, plusieurs clusters sont ainsi retrouvés sur différents chromosomes (Holland, 2001).

Cette particularité de regroupement des gènes homéotiques entraîne une expression de ces gènes tout à fait particulière. En effet, elle suit la **règle de colinéarité** : il existe une corrélation spatiale et temporelle entre la localisation du gène sur le chromosome et son expression au cours du développement embryonnaire. Plus un gène est situé dans la partie 3' du chromosome, plus il est exprimé précocement et dans la partie antérieure de l'embryon au cours du développement. Les gènes dans la partie 5' s'expriment plus tardivement et dans la partie caudale de l'embryon (Fig. 1). Il existe donc une relation entre l'axe antéro-postérieur de l'embryon et l'ordre des gènes homéotiques le long des clusters.

Une colinéarité quantitative est également observée (Williams et al., 2006). Lorsque plusieurs gènes homéotiques sont exprimés, ce sont les gènes situés le plus postérieurement qui dominent les gènes les plus antérieurs : il s'agit de la **prévalence postérieure**.

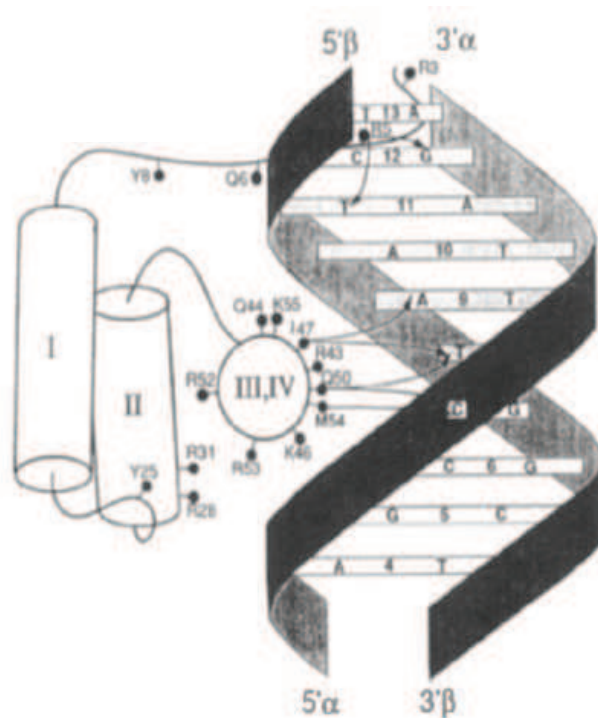
## B. Définition moléculaire

Une protéine exprimée à partir d'un gène homéotique possède, en général, un **homéodomaine**. Cet homéodomaine est bien conservé au cours de l'évolution. L'homéodomaine a été mis en évidence, pour la première fois par deux groupes, celui de McGinnis et celui de Scott et Weiner, en 1984. En effet, c'est en étudiant les gènes *Antennapedia* et *Bithorax* de la drosophile,



**Figure 2. Structure de l'homéodomaine.**

Représentation schématique des 3 hélices  $\alpha$  de l'homéodomaine d'Engrailed interagissant avec l'ADN (Abate-Shen, 2002).



**Figure 3. Complexe homéodomaine-ADN.**

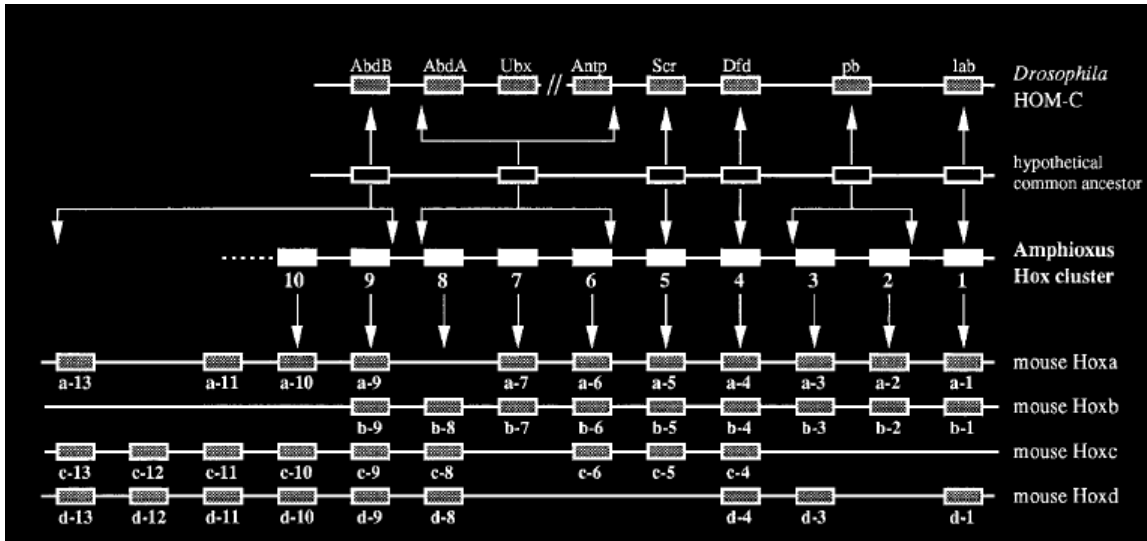
Représentation schématique de l'interaction entre l'homéodomaine D'Antennapedia et l'ADN. Les interactions entre les acides aminés et l'ADN sont indiquées par des flèches (Gehring et al., 1994).

qu'ils se sont aperçus que ces gènes codent pour des protéines possédant une séquence conservée d'acides aminés, codée par l'homéodomaine (McGinnis et al., 1984; Scott and Weiner, 1984).

L'homéodomaine est constitué de soixante acides aminés formant trois hélices alpha. La structure tertiaire est de type hélice-tour-hélice, permettant son interaction avec le sillon majeur de la double hélice d'ADN (Fig. 2). La partie N-terminale de l'homéodomaine peut interagir avec le sillon mineur de l'ADN via les arginines en position 3 et 5. La troisième hélice interagit avec l'ADN par des liaisons hydrophobes et par des ponts salins avec les groupements phosphates de l'ADN. La spécificité de séquence sur laquelle l'homéodomaine va se fixer, est conférée par les acides aminés isoleucine en position 47, glutamine en 50 et méthionine en 54 (numérotation des acides aminés pour l'homéodomaine d'Antennapedia définie par Gehring) (Fig. 3) (Gehring et al., 1994). La protéine possède également une séquence signal pour la localisation nucléaire, séquence généralement riche en acides aminés basiques.

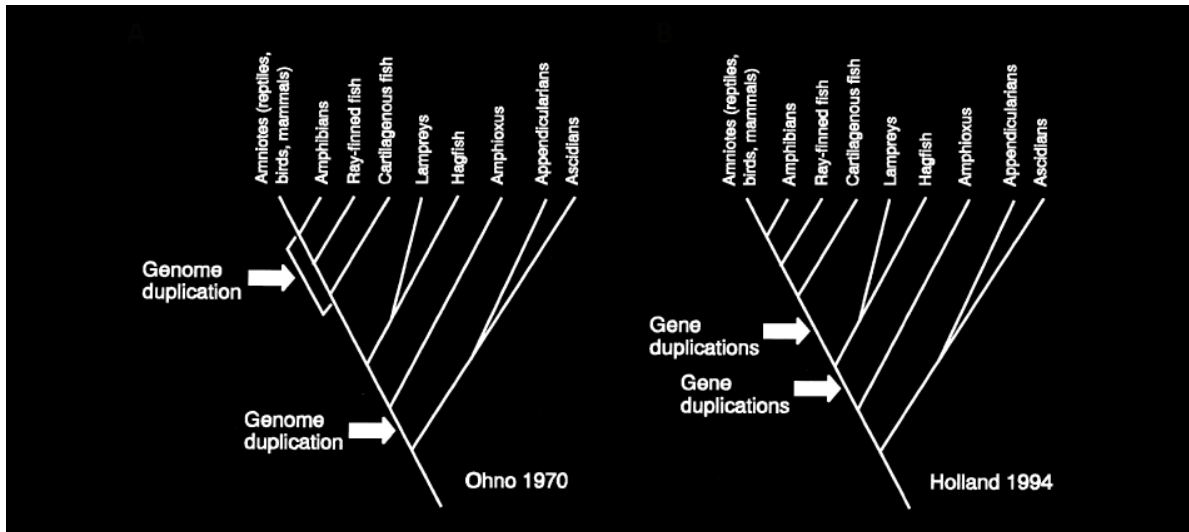
La première fonction d'une protéine à homéodomaine est d'être un **facteur de transcription**. En effet, en se fixant sur l'ADN, au niveau d'un site consensus riche en A et T (motif TAAT) situé généralement en amont du gène cible, la protéine va activer ou inhiber l'expression de ce gène.

La partie N-terminale de la protéine peut interagir avec des partenaires : c'est le **domaine de transactivation**. Cette partie étant variable au sein de la famille des protéines homéotiques, elle permet des interactions spécifiques et différentes pour chaque protéine homéotique. Ces interactions jouent également un rôle sur la spécificité de liaison de l'homéodomaine à l'ADN, modifiant ainsi le type de gène ciblé par le complexe. Par exemple, une grande majorité des protéines HOX interagissent avec la famille des PBX (membre de la sous-classe TALE des gènes homéotiques) via un motif (YPWM) précis situé dans leur partie N-terminale (Ladam and Sagerström, 2014). Cette interaction conduit à une fixation des HOX avec une meilleure affinité et sélectivité sur l'ADN cible. MEIS, un autre membre des TALE, peut également intervenir sur la régulation de l'activité des protéines HOX en modulant leur interaction avec PBX. Le complexe HOX/PBX devient répresseur notamment lors du recrutement de HDAC (Histone Désacétylase), un co-represseur de la transcription.



**Figure 4. Evolution des clusters de gènes *Hox*.**

Duplication de l'ancêtre commun du cluster de gènes *Hox* au cours de l'évolution en passant de la drosophile à l'amphioxus puis à la souris (Holland and Garcia-Fernandez, 1996).



**Figure 5. Schéma d'évolution du génome selon Ohno et Holland.**

Représentation du phylum des Chordés et de la position temporelle des duplications du génome selon Ohno (A) et Holland (B) (Holland, 1999).

## C. Phylogénie

L'évolution d'un organisme passe par l'évolution de son génome, ceci se traduisant par une augmentation du nombre et de la complexité des gènes qui le constituent. Les gènes homéotiques n'ont pas échappé à cette règle et ont vu leur nombre augmenter au cours de l'évolution. En comparaison, un céphalocordé, tel que l'amphioxus (espèce ayant divergé le plus tôt dans le phylum des chordés), possède dix gènes homéotiques regroupés sur un unique cluster (Garcia-Fernández and Holland, 1994). La drosophile contient huit gènes homéotiques, regroupés dans deux complexes : *Bithorax* et *Antennapedia* qui correspondent en réalité à un cluster coupé en deux complexes (Holland and Garcia-Fernández, 1996). Trois cent gènes homéotiques sont décrits chez l'être humain dont 235 seraient fonctionnels et 65 seraient des pseudogènes (Holland et al., 2007). Ils sont regroupés, dans la grande majorité, en quatre clusters de gènes *Hox* sur les chromosomes 2, 7, 12 et 17 et d'un cluster de gène *ParaHox* sur le chromosome 13 et 4 clusters de gènes *NKL* (Fig. 4).

L'augmentation du nombre de copies de certains gènes et, en conséquence de la complexité du génome, a permis aux organismes d'évoluer et d'acquérir de nouvelles caractéristiques telles que l'apparition d'un troisième feuillet embryonnaire et d'un tube digestif ou encore d'une symétrie bilatérale (Holland, 1999). Dans son article, paru en 1999 dans *Cell & Developmental Biology*, intitulé *Gene Duplication : Past, Present and Future*, Holland retrace l'histoire de l'évolution des gènes homéotiques (Fig. 5). Il cite Lewis comme étant le premier chercheur à avoir émis l'hypothèse d'une expansion du génome par sa duplication en tandem : il y a eu duplication horizontale du gène homéotique ancestral pour donner les autres copies. En parallèle, Ohno réalise également des travaux sur les gènes homéotiques de la drosophile. En analysant les complexes homéotiques *Bithorax* et *Antennapedia*, il constate que tous les deux possèdent une homéoboîte et en conclut une duplication du génome. Il propose alors un schéma d'évolution du génome en plaçant une première duplication verticale de ce dernier, sur le phylum des chordés en amont de l'embranchement des céphalocordés. Il ajoute une deuxième duplication au niveau du phylum des vertébrés. Holland, au vu de nouvelles données, replace chronologiquement ces duplications du génome : il situe la première duplication, par tétraploïdie, en aval de la séparation des céphalocordés. La deuxième duplication, en tandem, est placée sur le phylum des agnathes, après la divergence des lamproies et myxines. Brooke émet l'hypothèse que le cluster de gène *Hox* et celui de *ParaHox* sont apparus par duplication d'un cluster ancestral nommé *ProtoHox*. Il était alors composé de quatre gènes : *Anterior*, *PG3*, *Central* et *Posterior*, qui se sont ensuite dupliqués au cours de l'évolution (Brooke et al., 1998).

Class	Subclass	Number of gene families	Number of genes	Number of pseudogenes
ANTP	HOXL	14	52	0
	NKL	23	48	19 <sup>b</sup>
PRD	PAX	3	7 <sup>a</sup>	0
	PAXL	28	43	24 <sup>c, d</sup>
LIM		6	12	0
POU		7	16	8 <sup>e</sup>
HNF		2	3	0
SINE		3	6	0
TALE		6	20	10 <sup>f</sup>
CUT		3	7	3 <sup>g</sup>
PROS		1	2	0
ZF		5	14	1 <sup>h</sup>
CERS		1	5 <sup>i</sup>	0
<b>Totals</b>		<b>102</b>	<b>235<sup>a</sup></b>	<b>65<sup>b-h</sup></b>

<sup>a</sup>Includes *PAX2*, *PAX5* and *PAX8* that have a partial homeobox; excludes *PAX1* and *PAX9* that lack a homeobox.

<sup>b</sup>Includes *NANOGP11* that lacks a homeobox.

<sup>c</sup>Excludes intronless and repetitive *DUX1* to *DUX5* sequences.

<sup>d</sup>Includes *TPRX1P1* and *TPRX1P2* that lack a homeobox.

<sup>e</sup>Includes *POU5F1P7* and *POU5F1P8* that lack a homeobox.

<sup>f</sup>Includes *IRX4P1*, *TGIF2P2*, *TGIF2P3* and *TGIF2P4* that lack a homeobox.

<sup>g</sup>Includes *CUX2P1*, *CUX2P2* and *SATB1P1* that lack a homeobox.

<sup>h</sup>Includes *ZEB2P1* that lacks a homeobox.

<sup>i</sup>Excludes *CERS1* that lacks a homeobox.

**Figure 6. Classification des gènes de la classe des gènes à homéobox.**

Regroupement des gènes à homéobox humain dans 11 classes. *Cdx2* et *Hoxb7* appartiennent à la sous-classe HOXL de la classe ANTP (Holland et al., 2007).

Une classification, plus récente, des différents gènes homéotiques chez l'Homme permet de répartir les 300 gènes dans 11 classes suivant leur phylogénie et les domaines caractéristiques qui sont présent sur la protéine (Holland et al., 2007).

Les 11 classes sont les suivantes (Fig. 6) :

- ANTP (dérivant du gène *Antennapedia* de la drosophile), subdivisée en deux sous-classes : les gènes *NKL* (NK-like) et les gènes *HOXL* (HOX-like). Mon travail de thèse s'intéressera essentiellement aux gènes *Cdx2* et *Hoxb7*, faisant partie de la sous-classe *HOXL*. Plus précisément, *Cdx2* appartient à la famille *Postérieur* et *Hoxb7* au groupe *Central*.
- PRD (dérivant du gène *paired* de la drosophile), contenant les gènes *PAX* dont les protéines possèdent des domaines *paired-box*.
- LIM, codant pour des protéines ayant un domaine LIM (domaine d'interaction protéine-protéine) dans sa partie N-terminale en plus de l'homéodomaine.
- POU, codant pour des protéines ayant un domaine POU (domaine de liaison à l'ADN) dans sa partie N-terminale en plus de l'homéodomaine.
- HNF, codant pour des protéines ayant un domaine POU-like (même structure tridimensionnelle qu'un domaine POU classique).
- SINE, codant pour une protéine ayant un domaine SIX (domaine de liaison à l'ADN) dans sa partie N-terminale, en plus de l'homéodomaine.
- TALE (pour Three Amino Acid Loop Extension), codant pour des protéines ayant un homéodomaine atypique : intercalation de trois acides aminés supplémentaires entre la première et deuxième hélice alpha de l'homéodomaine.
- CUT, codant pour des protéines ayant un domaine CUT (domaine de liaison à l'ADN) dans sa partie N-terminale en plus de l'homéodomaine.
- PROS, codant pour des protéines ayant un domaine PROS (domaine de liaison à l'ADN) dans sa partie C-terminale en plus d'un homéodomaine atypique (insertion de trois acides aminés entre la deuxième et troisième hélice alpha).



- ZF (Zinc Finger), codant pour des protéines ayant des motifs en doigts de zinc en plus d'un ou plusieurs homéodomaines.
- CERS (Ceramide Synthase), codant pour des protéines transmembranaires.

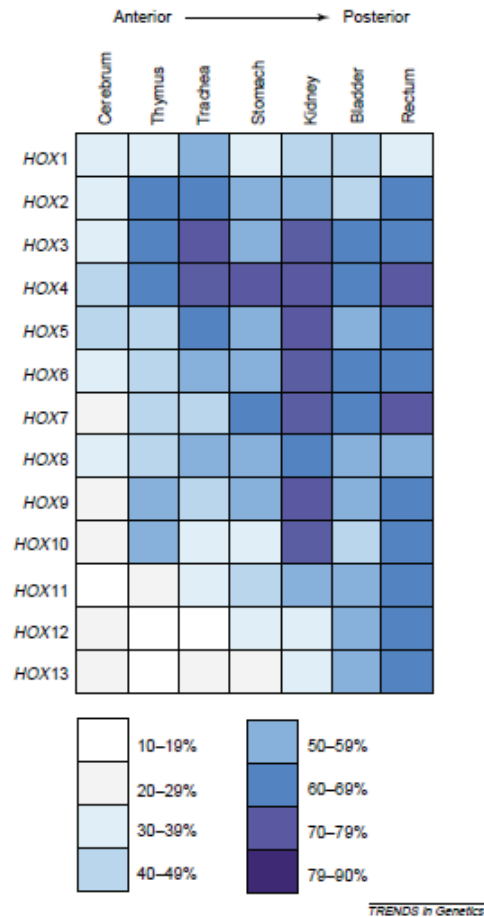
## 2. Les gènes homéotiques dans le développement

Les gènes homéotiques jouent un rôle très important au cours du développement embryonnaire. En effet, ce sont, parmi d'autres, ces gènes qui vont permettre de générer un être vivant complexe à partir du zygote issu de la fusion de deux gamètes.

L'embryon se développe à partir d'une cellule unique totipotente. Pour donner les différents types cellulaires, ainsi que pour former les organes et tissus qui le composent, l'expression de signaux spécifiques est nécessaire. Les gènes homéotiques sont activés au cours du développement et selon des règles de colinéarité spatio-temporelles, par des voies de signalisation en amont, tel que la voie des acides rétinoïques ou des BMPs (Bone Morphogenetic Protein). La première expression de gènes homéotiques est observée très tôt au cours de la gastrulation. C'est durant cette période que se met en place les principaux axes de l'embryon.

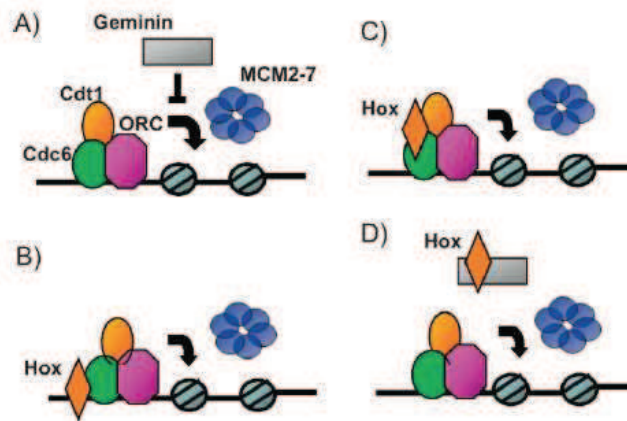
Plus tard, au cours du développement, les gènes homéotiques vont intervenir pour permettre l'organogenèse, organisée le long des axes de l'embryon, à partir des trois feuillets embryonnaires apparus lors de la gastrulation. De ce fait, les gènes homéotiques ont également un impact sur la taille et la forme de chaque organe ou tissu, mais également de l'embryon dans son ensemble (Mallo et al., 2010).

La dérégulation de gènes homéotiques au cours du développement entraîne des malformations de l'embryon qui peuvent être létales dans certains cas. Le plus fréquemment, car le plus facilement observable, ce sont les malformations du squelette qui sont mises en évidence. Les malformations, non létales, les plus communément observées chez l'être humain, affectent le développement des membres, comme par exemple la synpolydactylie (Grier et al., 2005).



**Figure 7. Expression des gènes *Hox* chez l'adulte.**

Niveau d'expression des différents gènes *Hox* (chaque *Hox* étant la combinaison des types A, B, C et D) dans les tissus adultes selon l'axe antéro-postérieur (Morgan, 2006).



**Figure 8. Rôles des protéines HOX sur la réplication de l'ADN.**

Schéma classique d'une origine de réplication inhibée par la Gémimine (A). HOX peut interférer dans ce schéma soit en aidant la fixation des protéines sur l'origine (B), soit en renforçant l'interaction entre les protéines du complexe (C) ou bien en séquestrant la Gémimine (D) (Miotto and Graba, 2010).

### 3. Les gènes homéotiques chez l'adulte

Chez l'adulte, l'expression des gènes homéotiques suit également la règle de colinéarité spatiale le long de l'axe antéro-postérieur. En effet, au niveau du cerveau, ce sont les gènes *Hox* situés dans la partie 3' du chromosome qui sont exprimés, alors qu'au niveau du rectum, ce sont les gènes positionnés en 5' (Fig. 7) (Morgan, 2006).

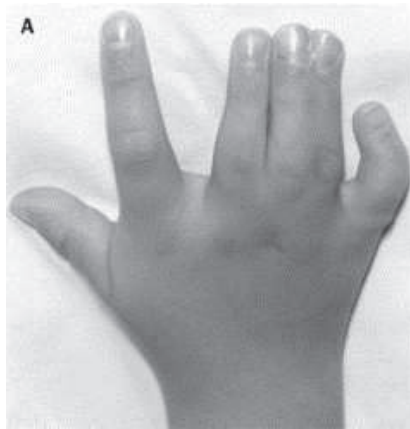
Ceci se retrouve également au niveau des organes présentant un développement selon l'axe antéro-postérieur tel que le tractus digestif ou l'appareil reproducteur femelle.

Les gènes homéotiques agissent comme des régulateurs de la transcription en activant ou inhibant l'expression de leurs gènes cibles. Par exemple, HOXB7, dans les cellules cancéreuses du sein, active l'expression du gène de l'*EGFR* (Epidermal Growth Factor Receptor) en se fixant directement sur son promoteur (Jin et al., 2012).

Les protéines homéotiques se fixent à l'ADN par leur homéodomaine et régulent l'expression de gènes impliqués dans des mécanismes importants pour le maintien de l'homéostasie du tissu où ils s'expriment, tel que la **différenciation**, la **prolifération** et la **survie cellulaire**.

A côté de ces **fonctions transcriptionnelles**, de nouvelles fonctions des protéines homéotiques sont de plus en plus révélées au grand jour :

- Les protéines HOX peuvent **contrôler la réplication** de l'ADN en se liant aux protéines de la machinerie de réplication : de nombreuses protéines HOX ont été identifiées comme interagissant avec la Geminine, inhibiteur de la réplication, permettant ainsi, par sa séquestration, l'activation de la réplication (Fig. 8) (Miotto and Graba, 2010).
- Les protéines homéotiques jouent également un rôle dans la **régulation de la traduction**. En effet, Bicoïd peut inhiber la traduction de *Caudal* chez la drosophile en se fixant, via son homéodomaine, sur la partie 3'UTR de l'ARN messager et en bloquant ainsi l'interaction de facteur nécessaire à l'initiation de la traduction (Niessing et al., 2002).
- Certaines protéines homéotiques ont été décrites comme pouvant franchir la membrane cytoplasmique et ainsi être sécrétées. Elles pourraient avoir d'autres **fonctions extracellulaires**. Par exemple, Engrailed est sécrétée afin de guider l'élongation des axones dans la formation de la rétine (Wizenmann et al., 2009). De même, la protéine HOXA5,



**Figure 9. Synpolydactylie.**

Une mutation dans le gène *Hoxd13* entraîne notamment une malformation des membres comme par exemple la fusion des doigts (Goodman, 2003).

retrouvée dans le milieu extracellulaire, peut être internalisée par un neurone et traverser les membranes pour aller au noyau. La protéine agit ainsi de manière paracrine (Chatelin et al., 1996). L'homéodomaine, en lui-même, a la capacité de traverser les membranes et ceci est dépendant de sa troisième hélice (Derossi et al., 1994).

- Enfin, HOXB7 a un rôle **stimulateur dans la réparation de l'ADN**. En effet, via son homéodomaine, HOXB7 peut interagir avec des protéines de la machinerie de réparation des cassures double-brins de l'ADN telles que le complexe KU70/80 et DNA-PKcs (DNA-dependent Protein Kinase Catalytic Subunit) ainsi que PARP (Poly(ADP-ribose) Polymerase) (Rubin et al., 2007; Wu et al., 2012).

**Durant ma thèse, j'ai pu mettre en évidence une nouvelle fonction non-transcriptionnelle de la protéine homéotique CDX2 dans la réparation des cassures de l'ADN.**

## 4. Les gènes homéotiques et les pathologies chez l'Homme

Les gènes homéotiques, tout comme le reste du génome, ne sont pas épargnés par les mutations et les dérégulations. Si ces modifications interviennent au cours du développement embryonnaire, elles peuvent entraîner des malformations. Si elles surgissent chez l'adulte, elles peuvent alors initier ou ralentir la transformation d'un tissu et le développement tumoral.

### A. Les malformations

Comme précisé plus haut, certaines malformations, notamment au niveau du squelette, peuvent résulter de mutations non létales de certains gènes homéotiques au cours du développement (Grier et al., 2005). Par exemple, la synpolydactylie est une malformation congénitale touchant les membres. Elle se caractérise par la fusion de deux ou plusieurs doigts (ou orteils). Cette anomalie est causée par la présence d'une mutation dans le gène *Hoxd13* (Fig. 9).

Le syndrome HFGS (Hand-Foot-Genital Syndrome) est lié à une mutation non-sens dans l'exon 2 de *Hoxa13*, induisant alors l'expression d'une protéine tronquée. Il est caractérisé par des malformations au niveau de l'extrémité des membres mais également au niveau de l'appareil urogénital.

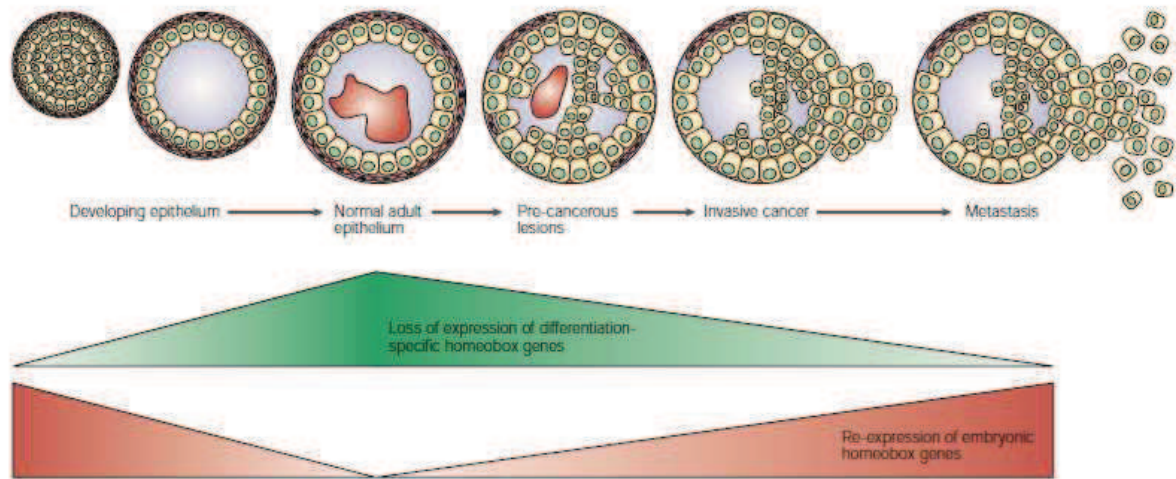
## B. Les cancers

Les gènes homéotiques sont impliqués dans bon nombre de cancers. **Les tumeurs présentent souvent une dérégulation de l'expression de gènes homéotiques**, due à l'activation ou à la répression de certaines voies régulant leur expression ou à des modifications épigénétiques de leur promoteur (telles que la méthylation). Plus rarement, cette dérégulation peut être associée à des mutations du gène ou de ses régions promotrices entraînant une surexpression ou une inhibition de l'expression du gène. Elle a pour conséquence de **moduler la survie cellulaire et la prolifération ainsi que la différenciation des cellules, ou l'entrée en apoptose, et promeut ainsi le développement tumoral** (Samuel and Naora, 2005; Shah and Sukumar, 2010).

L'exemple le plus marquant est celui des leucémies. En effet, ce type de cancer présente une forte dérégulation des gènes *Hox* (par exemple *Hoxb4*, *Hoxa9*) et *Cdx*. Cette dérégulation n'est que rarement associée à un réarrangement chromosomique. Elle est plus fréquemment due à une perte du contrôle de la régulation de leur transcription. Par exemple, une expression anormale de *Cdx2* est fréquemment observée dans les leucémies aiguës sans être nécessairement due à un réarrangement chromosomique entraînant cette expression, ou bien, à une mutation ou une modification épigénétique du promoteur (Fröhling et al., 2007).

Cependant, les gènes homéotiques peuvent quand même être soumis à des translocations chromosomiques. Les protéines de fusion ainsi générées, acquièrent de nouvelles fonctions ayant un pouvoir leucémogène. Par exemple, la fusion entre la partie N-terminale de la nucléoporine NUP98 et la partie C-terminale d'un HOX engendre une protéine ayant l'activité transcriptionnelle de NUP98 et un site de fixation via l'homéodomaine du HOX sur ses gènes cibles. Il en résulte une surexpression de gènes leucémogènes (Argiropoulos and Humphries, 2007).

Les protéines homéotiques peuvent également influencer le développement tumoral en interagissant avec d'autres protéines qui modulent leur activité. Par exemple, dans le tissu mammaire, HOXA5 interagit avec la protéine Twist et bloque ainsi l'activité anti-apoptotique de cette dernière dans le tissu sain. HOXA5 y exerce ainsi, une fonction suppresseur de tumeur (Stasinopoulos et al., 2005). A l'inverse, HOXB7 y exerce un rôle d'oncogène en interagissant avec les protéines du mécanisme NHEJ (Non Homologous End Joining), tel que KU70, et stimulant ainsi leur activité dans le mécanisme de réparation des cassures double-brins de l'ADN (Rubin et al., 2007).



**Figure 10. Relation entre l'expression des gènes *Hox*, le développement de l'épithélium et la carcinogénèse.**

Les gènes normalement exprimés dans un tissu différencié sont souvent perdus dans la carcinogénèse (vert). A l'inverse, les gènes s'exprimant dans les tissus indifférenciés en développement mais pas chez l'adulte sont réexprimés dans la carcinogénèse (rouge) (Abate-Shen, 2002).

Deux situations de dérégulation de l'expression des gènes homéotiques sont possibles ayant des conséquences différentes (Fig. 10) :

- **Un gène homéotique, normalement exprimé dans un organe, voit son expression diminuée ou perdue au niveau de la tumeur.** Ces gènes interviennent normalement dans la différenciation de la cellule et dans le maintien de l'homéostasie. La perte de l'expression de ce gène ne suffit pas à elle seule pour induire une tumeur. En revanche, elle engendre une dédifférenciation des cellules ainsi que leur prolifération ce qui peut prédisposer ces cellules à la transformation néoplasique. Par exemple, *Hoxa5* voit son expression diminuer par méthylation de son promoteur, dans le développement des tumeurs du sein (Raman et al., 2000).

**Dans cette situation, le gène homéotique se comporte comme un suppresseur de tumeur.**

- **A l'inverse, un gène homéotique peut s'exprimer de manière ectopique, dans un tissu où il ne l'est normalement pas.** Dans ce cas, l'expression du gène homéotique stimule la prolifération et la survie des cellules, et modifie leur différenciation. Ceci permet alors la transformation et la progression tumorale. Par exemple, l'expression ectopique de *Hoxa1* dans la glande mammaire induit la prolifération et la survie des cellules. Elle y inhibe la différenciation et l'apoptose et entraîne la transformation des cellules mammaires (Zhang et al., 2003).

**Dans cette situation d'expression ectopique, le gène homéotique agit comme un oncogène.**

Il est intéressant de noter ici que deux gènes, bien qu'appartenant à un même cluster de gènes *Hox*, *Hoxa1* et *Hoxa5* peuvent exercer **deux fonctions opposées**, oncogène et suppresseur de tumeur, au sein d'un même tissu, la glande mammaire.

L'expression de la protéine CDX2, comme autre exemple, est perdue dans l'épithélium intestinal lors de sa transformation tumorale et **Cdx2 y agit comme gène suppresseur de tumeur**. A l'inverse elle devient ectopique dans les leucémies aiguës où **Cdx2 exerce une fonction d'oncogène**. Le gène *Cdx2* est l'acteur principal de mon sujet de thèse. La complexité de ses rôles, suppresseur de tumeur et oncogène, est décrite plus en détail dans le chapitre II et fait l'objet de la première partie de mon travail de thèse.

De plus, tout comme HOXA1 et HOXA5 dans la glande mammaire, les deux protéines homéotiques CDX2 et HOXB7 s'opposent par leur fonction dans l'épithélium intestinal. L'étude comparative de ces deux protéines constitue la deuxième partie de mon projet de thèse.



## Chapitre II : Cdx2 et Hoxb7, deux gènes impliqués dans la cancérogenèse colique

Les gènes homéotiques sont des éléments importants du développement embryonnaire. Ils assurent le bon développement et la mise en place des différents organes de l'embryon. Chaque gène homéotique a une spécificité d'expression et intervient dans le développement d'un ou plusieurs organes bien spécifiques. **Dans le cas de la mise en place de l'intestin, ce sont notamment, les gènes Cdx (Caudal-type Homeobox) qui sont, en quelque sorte, les chefs d'orchestre.**

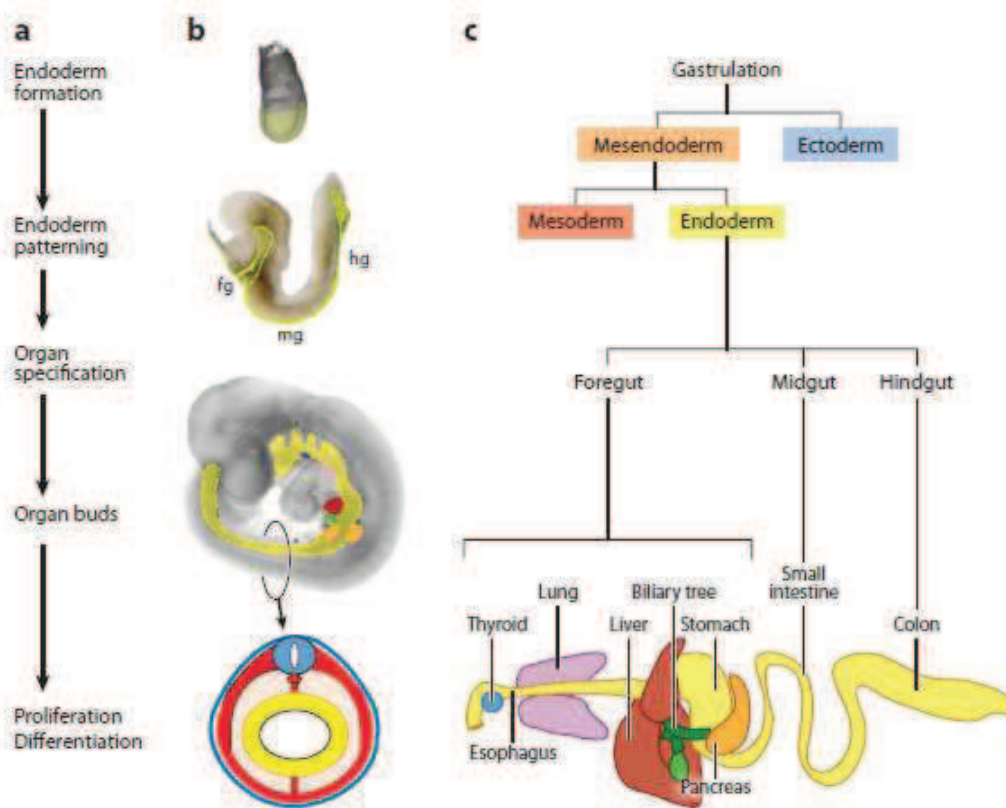
### 1. Le système digestif

Le tractus digestif assure trois grandes fonctions dans l'organisme : son rôle principal est la **digestion des aliments** et **l'absorption des nutriments** qui en résultent, mais il est aussi un **organe endocrine** puisqu'il sécrète bon nombre d'hormones, et un **organe immunitaire** afin de se défendre contre les agressions quotidiennes apportées notamment par l'alimentation.

#### A. L'organogenèse du tube digestif

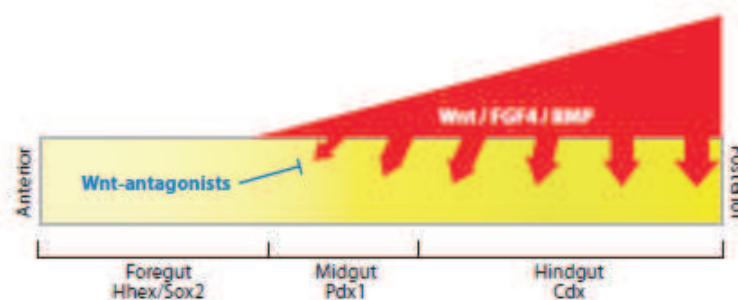
L'embryogenèse est divisée en plusieurs étapes, notamment trois grandes phases. La première est la **segmentation**, au cours de laquelle, l'œuf issue de la fécondation subit plusieurs divisions cellulaires, jusqu'à atteindre le stade de blastocyste. Ensuite, au cours de la **gastrulation**, se mettent en place les trois feuillets embryonnaires : l'ectoderme (qui donnera le système nerveux et l'épiderme), l'endoderme (qui évoluera en tube digestif et organes associés ainsi que le système respiratoire) et le mésoderme (qui se développera en muscles, squelette et système sanguin). A ce stade, l'embryon forme alors la gastrula. La dernière grande étape est **l'organogenèse** qui consiste en la mise en place des différents organes à partir des trois feuillets embryonnaires de la gastrula.

Lors de la gastrulation, commencent également à se mettre en place, les différents axes de l'embryon, tel que l'axe antéro-postérieur. Au niveau de l'endoderme, trois régions peuvent être



**Figure 11. Représentation schématique du développement embryonnaire.**

Représentation du développement et devenir de l'endoderme au cours de l'embryogenèse (Zorn and Wells, 2009).



**Figure 12. Régionalisation de l'endoderme intestinal.**

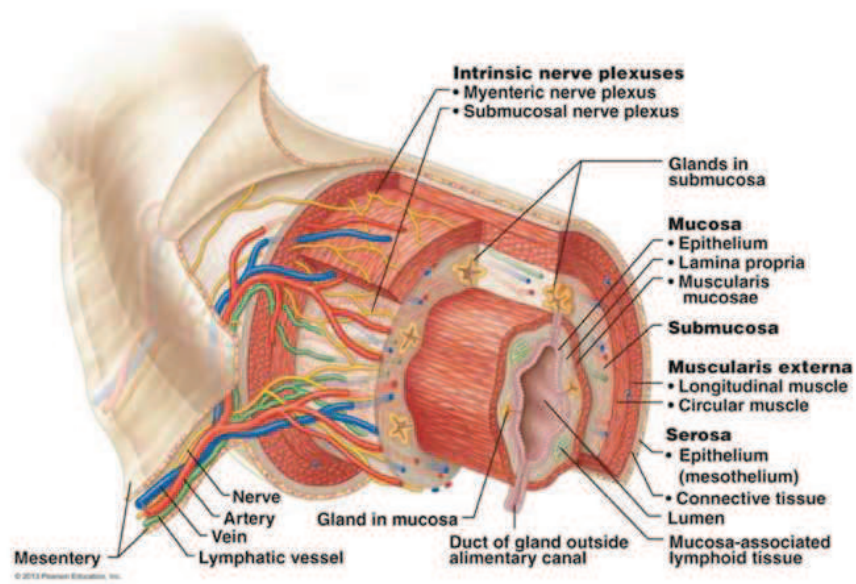
La mise en place de l'axe antéro-postérieur de l'endoderme intestinal est sous le contrôle de plusieurs voies dont les voies Wnt, FGF4 et BMP (Zorn and Wells, 2009).

identifiées le long de cet axe. La partie antérieure de l'endoderme correspond à l'intestin antérieur. Celui-ci formera l'épithélium des éléments les plus antérieurs du tube digestif : l'œsophage et l'estomac ainsi que les organes associés (foie, pancréas, vésicule biliaire) de même que l'épithélium du système respiratoire. La partie moyenne de l'endoderme se développera pour former l'épithélium de l'intestin grêle et de la partie antérieure du côlon. Enfin dans la partie postérieure, l'endoderme donnera l'épithélium de la majeure partie du côlon (Fig. 11) (Zorn and Wells, 2009).

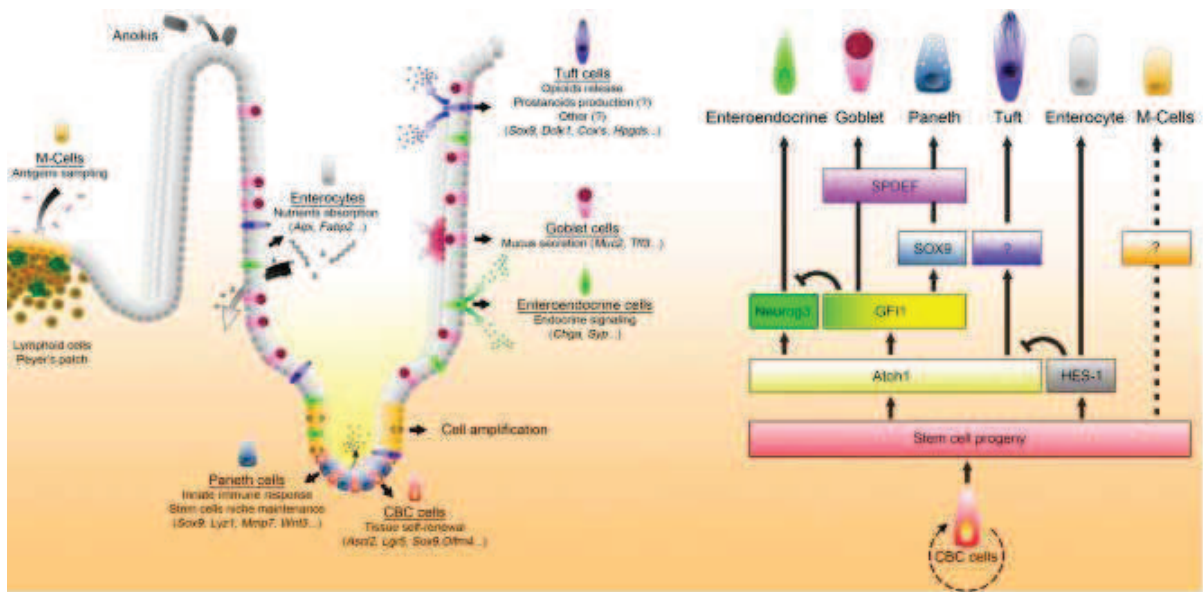
Cette régionalisation de l'endoderme en différentes parties du tube digestif nécessite l'intervention de voies de signalisation telles que les voies des acides rétinoïques (RA), de Wnt, du FGF (Fibroblast Growth Factor) et du BMP (Fig. 12). Ces facteurs permettent la bonne expression des différents gènes homéotiques, responsables de la différenciation en un élément donné du tube digestif, le long de l'axe antéro-postérieur. Les gènes *Cdx* interviennent, au niveau de l'endoderme moyen et postérieur, pour développer les intestins (intestin grêle et côlon).

A partir de cet endoderme, l'intestin se forme avec toutes ses caractéristiques, en association avec le mésenchyme splanchnique qui formera les couches musculaires lisses, puis avec les cellules issues de la crête neurale qui formeront le système nerveux entérique :

- La prolifération cellulaire permet l'élongation du tube en formation.
- La lumière du tube se forme.
- L'épithélium pseudostratifié devient monostratifié et repose sur la lamina propria, constituée de tissu conjonctif, vaisseaux sanguins et lymphatique, issue du mésoderme. L'axe cryptovillositaire se met en place.
- Les différentes couches de muscles lisses se forment (couche longitudinale, couche circulaire, couche musculaire muqueuse) autour du tube ainsi que les connexions nerveuses.
- L'épithélium se spécifie selon sa localisation le long de l'axe antéro-postérieur.



**Figure 13. Représentation des différentes couches du tube digestif.**  
(Pearson Education, 2013).



**Figure 14. Les cellules de l'épithélium intestinal.**

Représentation schématique des différentes cellules composant l'épithélium intestinal ainsi que leurs fonctions et les gènes impliqués dans leur différenciation (Gerbe et al., 2011).

## B. Le tube digestif adulte

Le tube digestif est segmenté en différentes régions le long de l'axe antéro-postérieur :

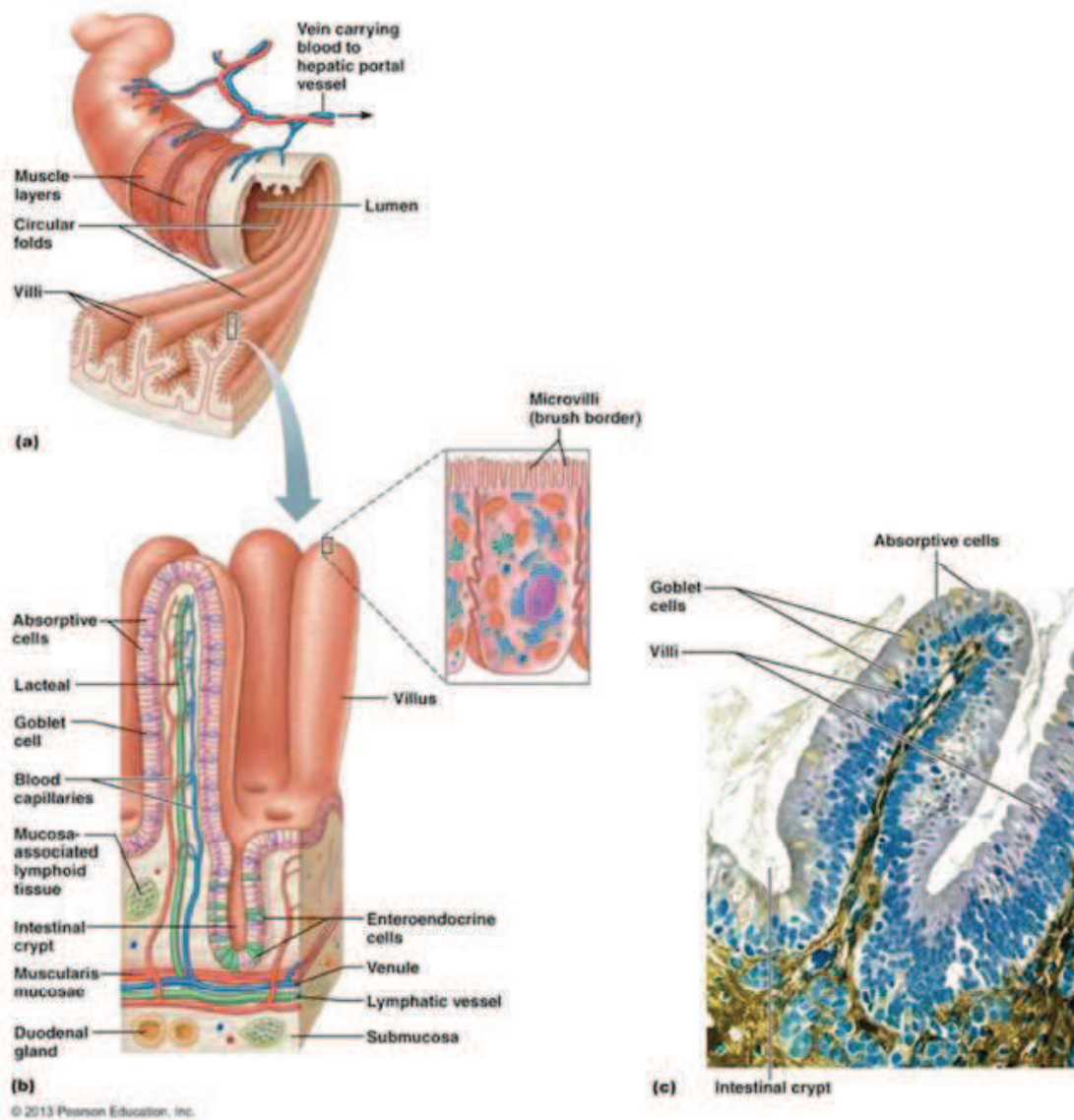
- La bouche.
- L'œsophage.
- L'estomac, où s'effectuent le brassage des aliments et le début de la digestion du chyme
- L'intestin grêle découpé en duodénum, jéjunum, iléon et cécum, qui assure la digestion et l'absorption des nutriments.
- Le côlon ascendant (ou droit), transverse et descendant (appelé aussi gauche) où s'effectue l'absorption de l'eau et la dégradation des déchets non-assimilables par l'organisme, par une flore bactérienne importante.

Il présente également différentes couches de tissus assurant les fonctions de **motricité**, **innervation**, **redistribution des nutriments**, **immunité** et **absorption**. De l'extérieur vers la lumière du tube, se trouve (Fig. 13) :

- La séreuse.
- Les muscles longitudinaux.
- Le plexus mésentérique.
- Les muscles circulaires.
- Les vaisseaux sanguins et lymphatiques.
- Le plexus sous-muqueux.
- La muqueuse formée de la lamina propria et de l'épithélium monostratifié.

L'épithélium monostratifié se renouvelle en permanence, environ tous les quatre jours, à partir de cellules souches situées au fond des cryptes et à partir desquelles se différencient cinq types de cellules (Fig. 14) :

- **Les cellules absorbantes** : entérocytes dans l'intestin, colonocytes dans le côlon, permettant l'absorption des nutriments. Ce sont des cellules très différenciées morphologiquement et fonctionnellement.
- **Les cellules sécrétrices** :
  - **cellules caliciformes** sécrétant le mucus (mucines) nécessaire à la protection de l'épithélium



**Figure 15. Structure de l'épithélium intestinal.**

Afin d'augmenter sa surface d'échange, l'épithélium forme des replis appelés valvules conniventes (a) elles-mêmes composées de cryptes et villosités (b). Chaque entérocyte présente également des microvillosités à son pôle apical (Pearson Education, 2013).

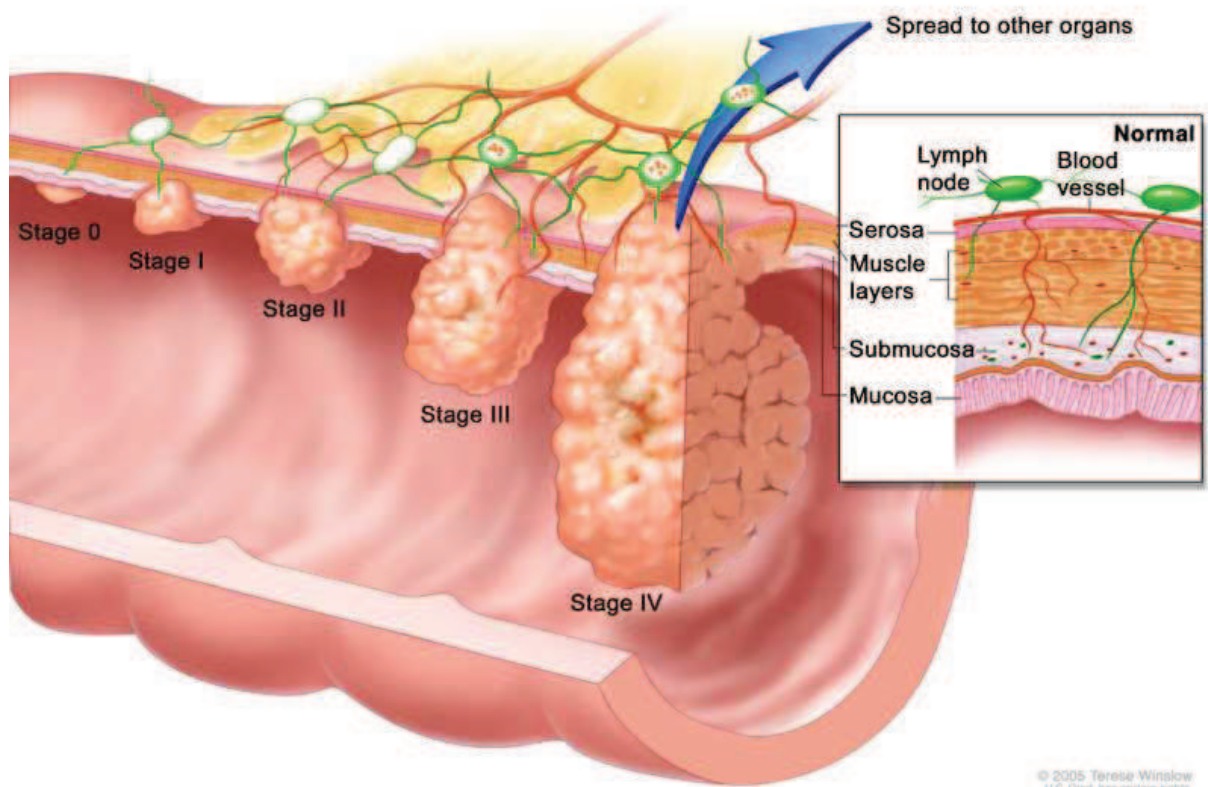
- **cellules entéroendocrines** sécrétant les hormones (par exemple la motiline, cholécystokinine...) qui régulent la digestion
- **cellules de Paneth** intervenant dans la réponse immunitaire (sécrétion de lysozyme, enzyme anti-bactérienne)
- **cellules à touffes** dont le lignage est encore controversé et dont la fonction reste à établir

L'intestin, afin d'augmenter sa surface d'échange avec le milieu extérieur, s'est doté d'une architecture bien spécifique. En effet, la muqueuse présente des replis, les **valvules conniventes**, elles-mêmes composées d'invaginations formant les **cryptes (glandes de Lieberkühn** dans le côlon) et d'évagination constituant les **villosités** (absentes au niveau du côlon). Les entérocytes, à leur pôle apical, présentent eux aussi des évaginations appelées **microvillosités** qui forment la bordure en brosse. Ainsi, grâce à tous ces replis, la muqueuse intestinale possède une surface d'échange et d'absorption très importante, de l'ordre de 250m<sup>2</sup> pour un humain adulte (Fig. 15).

De la lumière du tube digestif vers la profondeur des cryptes, la muqueuse intestinale présente un axe crypto-villositaire composé de trois parties :

- **La région basale**, au fond des cryptes, dans laquelle se situent les cellules souches et les cellules de Paneth.
- **La région de prolifération**, dans laquelle les nouvelles cellules issues des cellules souches, se divisent et prolifèrent afin d'assurer le renouvellement de l'épithélium.
- **La région de différenciation**, dans laquelle les nouvelles cellules se différencient en un type cellulaire intestinale.

Il y a ainsi un cycle de cellules assurant le renouvellement constant de l'épithélium : les cellules se multiplient dans les cryptes, puis se différencient en migrant vers la villosité (sauf les cellules de Paneth qui migrent en sens inverse pour se placer au fond des cryptes) et finissent leur vie au sommet des villosités où elles se détachent et meurent par anoïkis (mort cellulaire induite par la perte d'adhésion).



**Figure16. Différents stades d'évolution d'un carcinome.**

Représentation des différents stades d'un carcinome définis par sa taille, la présence de nodules lymphatiques touchés et de métastases (Terese Winslow, U.S. Govt., 2005)



## C. Le cancer colorectal

### a. Classification

Le cancer colorectal (CCR) touche 446 000 nouvelles personnes par an en Europe. C'est la deuxième cause de mortalité par cancer dans les pays développés après le cancer des poumons. Le taux de survie moyen après 5 ans est de 57% en France (Altobelli et al., 2014 ; donnée INCa). Cependant, plus le cancer est pris à un stade précoce, plus les chances de survie sont élevées.

Stade de la tumeur	Survie à 5 ans
Stade I	90%
Stade II	75%
Stade III	67%
Stade IV	8%

(Hollande et al., 2010)

La plupart des décès causés par le cancer du côlon, est due au développement des métastases (essentiellement au niveau du foie, des nœuds lymphatiques et des poumons). Plusieurs facteurs sont associés aux cancers colorectaux tels que la prédisposition génétique, le mode de vie (sédentarisation, tabagisme...), le régime alimentaire ou encore l'âge (Wei et al., 2009). De ce fait, le cancer colorectal représente un problème majeur de santé publique. La recherche dans ce domaine est donc importante et vise à comprendre les mécanismes et les causes du CCR afin de pouvoir le détecter le plus précocement, d'établir des thérapies efficaces et de le prévenir.

L'état d'avancement du CCR est défini par le stade de sa tumeur évalué par histologie. Ce stade est basé sur plusieurs critères (Fig. 16) (Markowitz et al., 2002) :

- **L'envahissement de la tumeur (T)** dans les différentes couches tissulaires du tube digestif : atteinte en T1 de la sous-muqueuse, en T2 de la couche musculaire, en T3 de la séreuse et en T4 dépassement de la séreuse.
- **L'atteinte des nodules lymphatiques à proximité de la tumeur (N).**
- **La présence de métastases (M).**

Au stade I, T1N0M0, la tumeur est localisée au niveau de la sous-muqueuse ; T2N0M0, elle envahit la couche musculaire.

Au stade II, T3N0M0, elle traverse la musculature ; T4N0M0, elle dépasse la séreuse. Cependant à ce stade, il n'y a pas de nodule touché ni de métastase.

Au stade III, la tumeur peut être de n'importe quelle taille mais des nodules sont affectés.

Au stade IV, il y a, en plus, présence de métastases à distance.

## **b. Traitement**

La première ligne d'attaque du CCR consiste à réséquer par chirurgie la tumeur (données INCa). Dans les CCR de stade I, l'acte chirurgical est souvent suffisant. Pour les stades plus avancés, il est très souvent associé à un traitement médicamenteux pouvant être de deux types : la chimiothérapie qui agit sur les cellules en division, et la thérapie ciblée composée d'anticorps monoclonaux dirigés contre une voie cellulaire précise (apoptose, croissance...). Le choix du traitement se base sur plusieurs critères variables d'un patient à un autre, notamment sur les caractéristiques de la tumeur, et se fait donc au cas par cas.

La chimiothérapie se compose, le plus classiquement, d'une combinaison de plusieurs drogues anti-cancéreuses qui ont pour but de stopper la réplication de l'ADN ou le cycle cellulaire. Pour le traitement des CCR de stade II et III, le FOLFOX administré au patient, se compose d'acide folique, d'oxaliplatine et de 5-FluoroUracil. Pour les CCR de stade IV, qui présentent alors des métastases, et quand la chirurgie n'est pas envisageable, il s'agit d'une chimiothérapie qui vise à améliorer la qualité de vie des patients, le FOLFIRI (acide folinique, 5-FluoroUracile et Irinotecan) (Hollande et al., 2010; Markowitz et al., 2002).

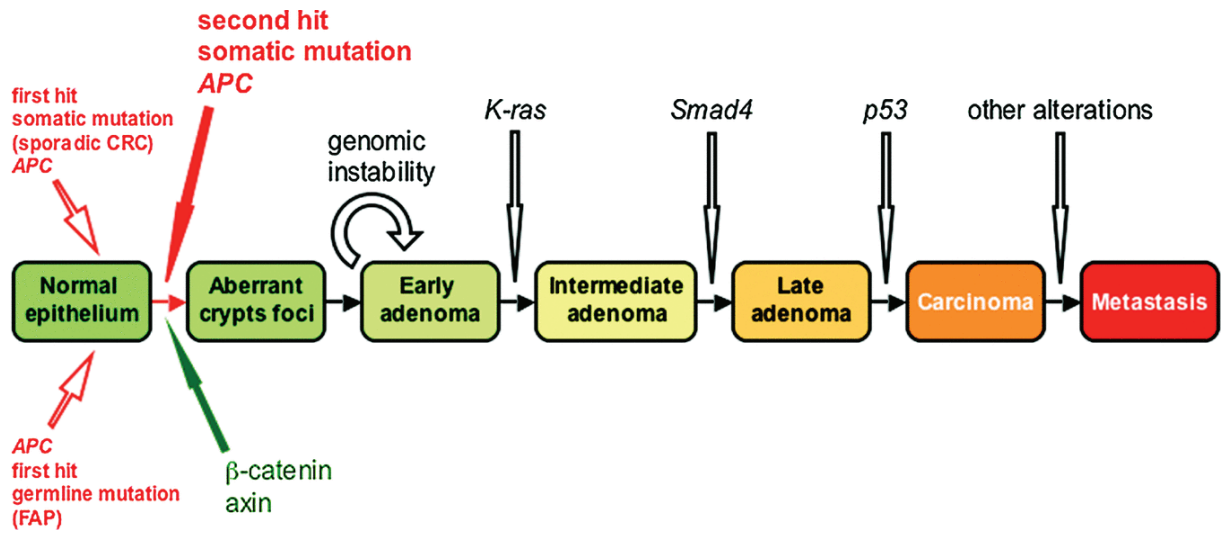
Les anticorps monoclonaux utilisés dans les thérapies ciblées sont de trois types : le Bevacizumab (Avastin®) dirigé contre le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) inhibe ainsi l'angiogenèse ; le Cetuximab (Erbix®) et le Panitumumab (Vectibix®) ciblent le récepteur à l'EGF (EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor) et réduit la survie et prolifération cellulaire.

### c. Développement du cancer

Le développement d'un CCR commence, dans 2/3 des cas par une **dysplasie** au niveau de l'épithélium du tube digestif. Il s'agit d'un amas cellulaire ayant une architecture altérée et formant un **polype adénomateux**. Cette lésion est, à ce stade, bénigne. Elle peut par la suite se transformer en une tumeur maligne de type adénocarcinome. Une forte hétérogénéité est observée au niveau intertumoral (entre les patients) mais aussi intratumoral (au sein même de la tumeur). Dans le cas de tumeur différenciée ayant un caractère invasif, de nombreuses cellules situées au niveau du front tumoral se différencient, subissent la transition épithélio-mésenchymateuse et sont à l'origine des métastases (Brabletz et al., 2005b). Les métastases circulent essentiellement par les vaisseaux lymphatiques pour atteindre les nœuds et par la circulation sanguine pour entrer dans le foie par la veine porte (chemin vasculaire direct entre le tube digestif et le foie). D'autres organes peuvent également être touchés par les métastases, moins fréquemment, tels que les poumons, les ovaires, le péritoine ou encore le cerveau (Brabletz et al., 2005a).

Les CCR issus de **polypes festonnés** (« serrated polyps ») représentent quant à eux 10% de l'ensemble des CCR. Ces polypes ont une morphologie typique qui est festonnée, l'épithélium présente une maturation accrue liée à une perte de l'activité apoptotique. Les altérations génétiques fréquemment observées dans ces lésions, affectent la voie des MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) par l'intermédiaire de BRAF et KRAS (Kirsten Rat Sarcoma) causant une altération de la prolifération et de la survie cellulaire, ainsi qu'une stimulation de l'invasion de la tumeur et la formation de métastases. Les polypes festonnés se transforment en CCR moins fréquemment que les polypes adénomateux. Cependant, les patients atteints d'un carcinome issus de ce type de lésion ont une survie à 5 ans plus faible ainsi qu'une moins bonne réponse aux traitements (Yamane et al., 2014).

Une troisième catégorie de lésions comprend les **adénomes plats**. Contrairement aux autres lésions, celle-ci ne se développe pas en relief et reste plane, et peut également présenter une zone de dépression en son centre. Les adénomes plats possèdent une forte altération génétique contenant des délétions et réarrangements chromosomiques. Ces adénomes ont un risque plus élevé de développer un carcinome agressif (Speake et al., 2007). Ils sont souvent retrouvés dans les cas de cancers sur muqueuse inflammatoire.



**Figure 17. Modèle de Fearon et Vogelstein.**

Représentation schématique des altérations génétiques rencontrées au cours du développement d'un CCR selon le modèle de Fearon et Vogelstein (adapté de Fearon et Vogelstein 1990, [www.biolcell.org](http://www.biolcell.org))

#### d. Aspects génétiques

Il existe deux grands modes d'émergence des CCR : les CCR sporadiques et les CCR héréditaires.

**Les cancers sporadiques** représentent 85% des CCR. Ils sont le fruit d'apparition de mutations somatiques dans le génome du patient. **Les cancers héréditaires** sont ceux causés par des mutations qui se transmettent de générations en générations.

Trois types génétiques majeurs de CCR sont classiquement distingués sur la base des altérations moléculaires qui sont à l'origine du développement tumoral.

- **Le type CIN** (Chromosome Instability), représentant 85% des CCR sporadiques, se caractérise par une instabilité des chromosomes, causée par des défauts dans le contrôle de la réplication de l'ADN. Ce type de cancer suit le modèle de Fearon et Vogelstein émit en 1990 (Fig. 17) (Fearon and Vogelstein, 1990). En analysant le génome de cancers CIN à différents stades, ils observent l'apparition de mutations typiques. Dans ce modèle, le premier évènement génétique conduisant à la transformation de l'épithélium est une mutation dans la voie Wnt/ $\beta$ -caténine [dans 80% des cas, c'est le gène *Apc* (Adenomatous Polyposis Coli) qui est touché]. Cette mutation a un impact non seulement sur la prolifération de la cellule mais également sur son adhésion, son état de différenciation et sa migration (Aoki and Taketo, 2007). S'ensuit, au cours du développement tumoral, d'autres mutations affectant des suppresseurs de tumeur tel que *p53* (régulant notamment l'apoptose) ou des oncogènes tels que *K-ras* (rôle dans la prolifération).
- **Le type MIN** (Microsatellite Instability), représentant 15% des CCR, est causé par des mutations de gènes du système de réparation des mésappariements de l'ADN (MMR : Mismatch Repair) [les gènes *mlh1* (MutLHomolog), *msh2* (MutSHomolog) ou *msh6*] générant l'expansion ou la contraction de microsatellites (courtes séquences répétitives d'ADN). (Molatore and Ranzani, 2004) .
- **Le type méthylateur ou CIMP** (CpG Island Methylator Type) représente 5 à 10% des CCR. Il présente une hyperméthylation de certaines régions de l'ADN conduisant à une perte de l'expression de gènes lorsqu'elle affecte leur promoteur (par exemple le gène *mlh1* ou *B-raf*) (Sideris and Papagrigroriadis, 2014; Weisenberger et al., 2006).

Néanmoins, des études récentes sur des grandes séries de patients et à l'échelle du génome entier ont conduit à proposer l'existence de 4, voire 6, classes majeures de CCR sur la base des profils de transcriptome (De Sousa E Melo et al., 2013; Marisa et al., 2013).

Dans le cas des cancers héréditaires, les mutations, présentes dans les cellules germinales, se transmettent de générations en générations (Fearon, 2011; Lynch and de la Chapelle, 2003; Rustgi, 2007).

**Le syndrome de Lynch ou HNPCC** (Hereditary Non Polyposis Colorectal Cancer) présente une mutation germinale des gènes impliqués dans le mécanisme de réparation MMR ; il s'agit d'un cancer de type MIN héréditaire. Les patients ayant hérité de cette mutation ont 50 à 70% de risques de développer un CCR vers l'âge de 45 ans (Sehgal et al., 2014). Ce syndrome représente 3% des CCR.

**Le Syndrome de FAP** (Familial Adenomatous Polyposis) est causé par une mutation germinale du gène suppresseur de tumeur *Apc*. Les patients développent de nombreux polypes adénomateux au niveau du côlon vers l'âge de 20 ans, dont certains peuvent évoluer en CCR. Ce syndrome représente 1% des CCR.

**Les syndromes de polyposes hamartomateuses** regroupent les syndromes de Peutz-Jeghers, de polypose juvénile, de Cowden et la polypose adénomateuse multiple. Les patients présentent des hamartomes (malformation tissulaire) au niveau du tube digestif. Suivant le syndrome, différents gènes sont touchés par une mutation germinale. Dans le syndrome de Peutz-Jeghers, le gène portant la mutation est *STK11/LKB1* (Forcet et al., 2005). Pour le syndrome de polypose juvénile, *Smad4* est affecté. Dans celui de Cowden, il s'agit de *PTEN*. Enfin dans la polypose adénomateuse, le gène muté est *Myh*. Les patients présentant ces syndromes sont prédisposés au développement de CCR.

#### e. Les cellules souches cancéreuses

Les tumeurs possèdent une petite population de cellules qui ont les caractéristiques des cellules souches : capacités à se renouveler, proliférer et se différencier. Elles sont appelées **cellules souches cancéreuses** (CSC). Ces cellules, à un état indifférencié, constituent en quelque sorte un réservoir de cellules pour former la tumeur. En effet, elles peuvent proliférer afin d'augmenter leur nombre puis se différencier en un sous-groupe hétérogène de cellules cancéreuses. Elles sont donc à l'initiation du développement et de la croissance tumorale. Les CSC sont bien souvent résistantes aux traitements et peuvent donc engendrer des échecs dans les traitements médicamenteux. De plus,

étant donné que ce sont ces cellules qui assurent la croissance tumorale, il faudrait pouvoir les cibler spécifiquement, avec un traitement, afin d'empêcher la reformation de nouvelles cellules tumorales. Pour cela, il faut un moyen de les identifier et de les cibler, notamment par l'intermédiaire d'un marqueur spécifique à ces cellules. Un marqueur identifié à ce jour est le CD133 (Cluster of Differentiation 133), une glycoprotéine transmembranaire. Il pourrait constituer une cible pour générer un anticorps monoclonal afin de traiter les cancers possédant des cellules CD133 positives, mais ces résultats sont encore controversés (Ren et al., 2013). En outre, le ciblage spécifique des CSC se heurte à la plasticité cellulaire des cellules cancéreuses qui conduit des cellules cancéreuses non-souches à devenir des CSC.

## 2. Les gènes *Cdx*

Les gènes *Cdx* font partie de la famille des gènes homéotiques. Ils codent pour des **facteurs de transcription à homéodomaine**. Chez l'Homme, il y a trois membres : CDX1, CDX2 et CDX4.

Les protéines CDX se fixent, en tant que facteur de transcription, sur des séquences spécifiques au niveau du promoteur de leur gène cible : TTTAT(A/G/T)(G/A) grâce à leur homéodomaine. Cet élément de la protéine est composé de 60 acides aminés formant 3 hélices alpha.

Les homéodomains de CDX1 et CDX2 présentent une grande homologie de séquence entre eux, en effet ils ont en commun 55 acides aminés sur 60. Au niveau des promoteurs, *Cdx1*, contrairement à *Cdx2* possède une TATA-box (Freund et al., 1998).

### A. *Cdx1*

Au cours du développement embryonnaire, *Cdx1* intervient dans la mise en place de l'axe antéro-postérieur du squelette et dans le développement du tube digestif (Freund et al., 1998; Subramanian et al., 1995). Cependant, la perte de fonction de CDX1 n'est pas létale, ni au cours du développement embryonnaire ni au cours de la vie postnatale, ce qui suggère que d'autres gènes exercent une fonction redondante et compensatrice de CDX1 au cours du développement embryonnaire et dans l'intestin adulte (Bonhomme et al., 2008; Subramanian et al., 1995).

Chez l'adulte sain, *Cdx1* est exprimé spécifiquement dans l'épithélium intestinal selon un gradient antéro-postérieur ; sa concentration est croissante du duodénum vers le côlon distal. Elle suit également un gradient selon l'axe crypto-villositaire : la protéine est plus abondante au niveau du compartiment prolifératif des cellules épithéliales digestives, dans les cryptes, que dans les cellules différenciées (Guo et al., 2004).

*Cdx1* stimule la prolifération des cellules épithéliales intestinales des cryptes ainsi que l'expression des gènes spécifiques de l'intestin, permettant la différenciation des cellules souches en l'un des quatre types cellulaires composant l'épithélium (cellules absorbantes, cellules à mucus, cellules entérocrines et cellules de Paneth) (Lorentz et al., 1997; Soubeyran et al., 1999).

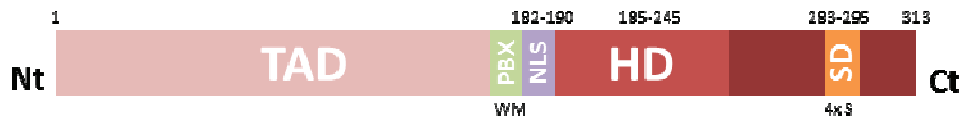
L'expression de *Cdx1* est fréquemment diminuée dans les cancers colorectaux. Deux mécanismes d'inhibition de son expression sont possibles. Le premier et le plus fréquent, étant une hyperméthylation de son promoteur, empêchant ainsi son expression (Pilozzi et al., 2004). Le deuxième est un évènement de réarrangement chromosomique ; en effet le gène *Cdx1* se situe dans le même locus que le gène *Apc* qui subit communément des réarrangements lors de la carcinogenèse colique (Domon-Dell et al., 2003; Guo et al., 2004). Néanmoins, la perte de fonction de *Cdx1* ainsi que sa sur-expression spécifiquement dans l'épithélium intestinal, n'ont pas d'impact majeur sur la cancérogenèse intestinale chez la souris (Bonhomme et al., 2008; Calon et al., 2007b).

## B. *Cdx4*

Chez le poisson zèbre, *Cdx4* intervient au cours de l'embryogenèse, dans la formation du tissu sanguin : l'hématopoïèse. Il agit de manière redondante avec *Cdx1* en régulant l'expression de différents gènes *Hox* nécessaires à la mise en place du tissu hématopoïétique (Davidson et al., 2003).

Chez la souris, une expression de *Cdx4* est observée très tôt au cours du développement, au niveau de la partie postérieure du tube digestif lors de son invagination (Beck, 2004). *Cdx4* joue également un rôle au cours du développement hématopoïétique chez l'adulte. Il est exprimé au niveau des cellules progénitrices hématopoïétiques et dans les cellules mononuclées de la lignée sanguine. Dans certains cas de leucémies myéloïdes aiguës, une expression ectopique de *Cdx4* est observée. Elle entraîne une dérégulation de gènes *Hox* leucémogènes (Bansal et al., 2006).





**Figure 18. Schéma de la protéine CDX2.**

CDX2 est composée d'un domaine de transactivation (TAD), un site de fixation pour PBX dont les acides aminés importants et conservés au cours de l'évolution sont un tryptophane (W) et une méthionine (M), d'un site de localisation nucléaire (NLS), d'un homéodomaine (HD) et d'une partie C-terminale où se situe un domaine de stabilisation (SD) composé d'un motif de quatre sérines (S).

## C. *Cdx2*

### a. CDX2, une protéine à homéodomaine

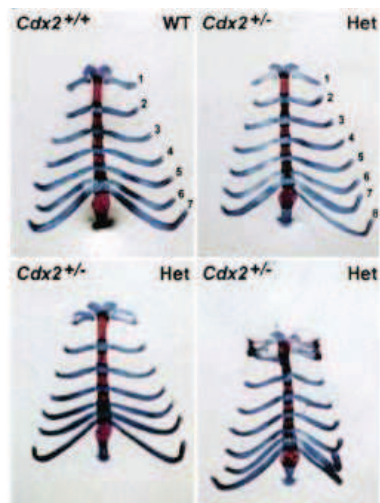
La protéine humaine CDX2 est composée de 313 acides aminés pouvant être regroupés en trois grands domaines (Fig. 18) :

- Dans la partie N-terminale se situe le **domaine de transactivation** qui module l'activité transcriptionnelle de la protéine CDX2 sur ses gènes cibles. Il contient également dans sa partie proche de l'homéodomaine, un site de fixation pour PBX (Rawat et al., 2008) ainsi qu'un signal de localisation nucléaire.
- Dans la partie centrale, se trouve l'**homéodomaine**, région très conservée au cours de l'évolution, qui permet à CDX2 de se fixer sur les promoteurs de ses gènes cibles.
- Dans sa partie C-terminale, est localisé le **domaine de stabilisation** de CDX2. Cette zone contient notamment un motif, conservé au cours de l'évolution, comprenant quatre sérines. Ces sérines sont importantes pour la stabilité de la protéine puisque leur phosphorylation entraîne un signal de dégradation par le protéasome (Gross et al., 2005).

Au laboratoire, nous avons également mis en évidence un variant d'épissage de CDX2, appelé miniCDX2, dans lequel la partie N-terminale de CDX2 est remplacée par un peptide de 12 acides aminés. Ce variant se comporte comme un dominant-négatif sur l'activité transcriptionnelle de CDX2 (le manuscrit soumis, dans lequel je suis troisième auteur, est présenté dans le troisième chapitre des résultats).

### b. *Cdx2* dans l'embryogenèse

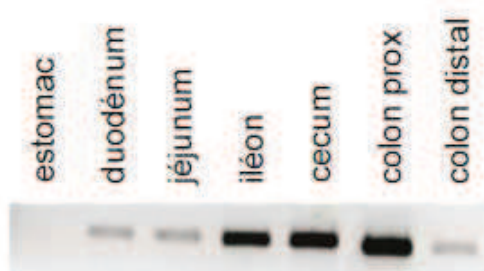
Le profil d'expression de *Cdx2*, au cours de l'embryogenèse, est décrit pour un embryon de souris. Son expression apparaît dès le stade 8-16 cellules puis se concentre au niveau des cellules périphériques des blastocystes, qui donneront la partie extra-embryonnaire, le trophoctoderme (Jedrusik et al., 2008; Strumpf et al., 2005). Au stade E3,5, *Cdx2* s'exprime donc dans le trophoctoderme, puis au niveau du chorion et du bourgeon allantoïque. *Cdx2* participe ainsi à la formation des annexes embryonnaires. En conséquence, les embryons de souris *Cdx2*<sup>-/-</sup> meurent



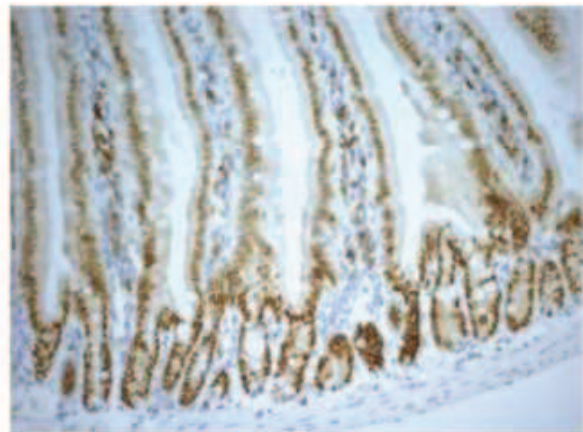
**Figure 19. Implication de *Cdx2* dans le développement du squelette.**

Les souris hétérozygotes pour *Cdx2* présentent des anomalies du squelette notamment au niveau des vertèbres et des côtes (Chawengsaksophak et al., 1997).

A



B



**Figure 20. Expression de *Cdx2* chez l'adulte sain.**

Expression de *Cdx2* le long du tractus digestif de la souris par RT-PCR (A). Immunohistochimie sur un épithélium d'intestin grêle murin présentant l'expression de CDX2 le long de l'axe cryptovillositaire (B) (Benahmed et al., 2008).

entre 3,5 et 5,5 jours post coïtum (p.c.) du fait de l'absence de ces annexes, notamment le chorion, indispensable au développement de l'embryon (Ralston and Rossant, 2008). L'expression embryonnaire de *Cdx2* débute après la gastrulation (E7). *Cdx2* s'exprime au niveau des cellules de la masse interne puis dans la partie postérieure des trois feuillets embryonnaires : l'endoderme distal, le bourgeon caudal (mésodermique) et le neurectoderme postérieur à l'origine du tube neural postérieur. A ce stade, *Cdx2* intervient dans l'élongation postérieure de l'embryon et la détermination de l'axe antéro-postérieur. En effet, les embryons *Cdx2*<sup>+/-</sup> sont viables et présentent différentes anomalies notamment au niveau du squelette : les vertèbres montrent un décalage antéro-postérieur. Elles ont subi une homéose similaire à celle observée chez les souris *Cdx1*<sup>-/-</sup> (Fig. 19) ; la queue, plus courte que chez les sauvages, arbore une morphologie typique dite en « tire-bouchon ». En plus de cela, les souris sont de taille inférieure comparée à celle des sauvages (Chawengsaksophak et al., 1997; Chawengsaksophak et al., 2004). Vers 12,5 jours p.c., l'expression se restreint progressivement à l'endoderme intestinal où elle se maintient tout au long de la vie adulte. Les souris *Cdx2*<sup>+/-</sup> présentent également des anomalies au niveau distal du tube digestif. En effet, dans le cécum et le côlon proximal, se développent des hétéroplasies de type gastro-oesophagien, associées à une perte locale de l'expression de *Cdx2* (Beck et al., 1999; Chawengsaksophak et al., 1997; Stringer et al., 2008). Ces observations suggèrent que le gène *Cdx2* participe à la détermination de l'identité intestinale de l'endoderme postérieur. Pour démontrer définitivement ceci et pour surpasser la létalité embryonnaire des individus *Cdx2*<sup>-/-</sup>, des souris, dont l'inactivation de *Cdx2* est conditionnelle, ont été générées. L'inactivation conditionnelle de *Cdx2* après la gastrulation, au niveau de l'endoderme intestinal entraîne une transformation du tissu normalement intestinal en un type gastrique ou œsophagien (Gao et al., 2009; Grainger et al., 2010). Ceci démontre la nécessité de l'expression du gène homéotique *Cdx2*, au cours du développement embryonnaire, pour donner une identité intestinale à l'endoderme moyen et postérieur.

### c. *Cdx2* chez l'adulte sain

Chez l'adulte sain, *Cdx2* est exprimé exclusivement au niveau de l'épithélium digestif selon un gradient de concentration croissant du duodénum vers le côlon proximal, puis décroissant au niveau du côlon distal (Fig. 20) (Benahmed et al., 2008; James et al., 1994).

*Cdx2* s'exprime au niveau des cellules souches intestinales et des cellules différenciées le long de l'axe crypto-villositaire, à l'exception des cellules de Paneth. Son expression est plus forte au

niveau des cellules des villosités comparée à celle des cellules des cryptes de l'intestin (Freund et al., 1998; Silberg et al., 2000).

Plusieurs modèles d'inactivation conditionnelle ont été produits dans l'intestin des souris adultes afin d'y définir la fonction de *Cdx2*. L'inactivation conditionnelle du gène *Cdx2*, chez la souris adulte en croisant les souris *Cdx2*<sup>flox/flox</sup> avec des souris *VilCre*<sup>ERT2</sup>, a pour conséquence une perte de la différenciation intestinale qui s'accompagne d'une perte de poids et de diarrhées dues à la réduction de l'efficacité dans l'absorption des nutriments, en raison d'une diminution de la taille des villosités et du nombre de cellules proliférantes ; ceci conduit au décès des animaux au bout de 2-3 semaines par défaut de fonction digestive (Hryniuk et al., 2012; Verzi et al., 2011). La perte de fonction « mosaïque » de CDX2 dans une proportion limitée des cryptes et des villosités (souris *Cdx2*<sup>flox/flox</sup> x *AhCre*<sup>ERT</sup>) a permis de prévenir le décès et d'étudier les conséquences à long terme de la déficience en CDX2 (Stringer et al., 2012). Les zones invalidées de l'épithélium présentent une perte de différenciation intestinale au profit d'une différenciation gastrique ainsi qu'une réduction de la prolifération cellulaire dans les cryptes. Au bout de quelques semaines, la grande majorité des cryptes dans lesquelles *Cdx2* a été invalidé sont perdues en raison du défaut de prolifération et sont remplacées par l'hyperprolifération des cryptes adjacentes normales dans lesquelles le gène *Cdx2* n'a pas été invalidé. Seules quelques cryptes invalidées pour *Cdx2* subsistent à long terme dans la profondeur de la muqueuse intestinale et forment des cystes dans lesquels les cellules prolifèrent peu et les cellules de Paneth sont perdues. Ces cystes évoluent en lésions polypoïdes, apparemment non cancéreuses, au niveau de la région péri-cécale. Enfin, le dernier modèle qui a été développé a également consisté à invalider le gène *Cdx2* de façon « mosaïque », mais sélectivement dans les cellules souches actives de l'intestin (souris *Cdx2*<sup>flox/flox</sup> x *Lgr5Cre*<sup>ERT2</sup>) (Stringer et al., 2012). Ces souris présentent un phénotype similaire à celui des souris *Cdx2*<sup>flox/flox</sup> x *AhCre*<sup>ERT</sup>, ce qui démontre l'importance de *Cdx2* dans les cellules souches. De plus, les cellules souches (*Lgr5*+) déficientes en *Cdx2*, isolées puis mises en culture, sont incapables de former des organoïdes intestinaux contrairement aux cellules souches sauvages.

Tandis que la perte de fonction perturbe considérablement l'homéostasie intestinale, la surexpression de *Cdx2* au niveau de l'intestin engendre un retard de croissance et une mort des souris lors du sevrage, causés par une maturation précoce de l'épithélium intestinal, empêchant la digestion et l'absorption correctes des nutriments. Les souris présentent également une désorganisation de la crypte marquée par la perte des cellules de Paneth (Crissey et al., 2011). **Ceci montre le rôle important de *Cdx2* dans l'homéostasie de l'épithélium intestinal et son bon fonctionnement.**

Globalement, ces expériences démontrent que *Cdx2* est un gène essentiel dans l'intestin adulte, qui exerce principalement trois fonctions cruciales de l'homéostasie:

- Il détermine et maintient l'**identité intestinale** des cellules souches actives (Lgr5+).
- Il participe à l'**organisation cellulaire** de la niche des cellules souches en contrôlant la production des cellules de Paneth.
- Il intervient dans la **différenciation** terminale des cellules intestinales matures.

#### d. Fonctions moléculaires de CDX2

La protéine CDX2 est composée de trois domaines importants, la partie N-terminale, contenant le domaine de transactivation, au centre, l'homéodomaine et dans la partie C-terminale, le domaine de stabilisation de la protéine. Communément, dans un facteur de transcription à homéodomaine, l'homéodomaine sert à la fixation de la protéine sur l'ADN et le domaine de transactivation permet l'activation de la transcription du gène cible par le recrutement de la machinerie transcriptionnelle. Cependant, plusieurs travaux ont démontré que suivant la cible et le mode d'action de CDX2, différentes parties de sa protéine sont nécessaires. Chaque partie de CDX2 constitue donc un élément indispensable pour l'ensemble de ses fonctions transcriptionnelles et non-transcriptionnelles au sein de la cellule.

La principale fonction de CDX2 est celle de **facteur de transcription**. En se fixant à l'ADN, au niveau de promoteurs de gènes cibles, CDX2 permet leur transcription. Cependant, outre cette action, CDX2 peut également réguler l'expression de gènes indirectement. Enfin, d'autres fonctions, indépendantes de celles-ci ont également été décrites.

#### i. Fonctions transcriptionnelles

Le mode d'action le plus connu de CDX2 est l'activation de l'expression de gènes spécifiques en se fixant sur une séquence promotrice du gène cible au niveau d'un site consensus riche en AT, qui a été initialement définie en employant la méthode SELEX : A/CTTTATA/G (Margalit et al., 1993). Cependant, CDX2 peut également se fixer sur d'autres séquences.

Une étude récente, par immunoprécipitation de chromatine, indique que la protéine CDX2 régule l'expression de plus de 14000 gènes dans les cellules intestinales (Verzi et al., 2010b). Il s'agit

donc d'un régulateur transcriptionnel majeur dans ces cellules. CDX2 régule l'expression de gènes différents suivant que la cellule est au stade prolifératif ou de différenciation. Dans les cellules proliférantes, CDX2 occupe majoritairement des promoteurs contenant des régions riches en motif GATA et TCF/LEF (Verzi et al., 2010a; Verzi et al., 2010b) tandis que dans les cellules différenciées, il se fixe au niveau de régions riches en motif HNF4 (Natoli et al., 2013; Verzi et al., 2010b). L'activation des gènes par CDX2 et des cofacteurs permet donc d'avoir une régulation suivant le stade de différenciation de la cellule mais également dépendante du type cellulaire.

Les protéines homéotiques possèdent un homéodomaine qui est relativement bien conservé et qui se fixe sur une séquence riche en AT. La spécificité de fonction des différentes protéines homéotiques est portée par leur domaine N-terminal ou C-terminal. Ainsi, dans le cas de CDX2 et CDX1, dont l'homéodomaine est semblable à 96,6%, la partie C-terminale de ces protéines est importante puisqu'elle permet de définir la spécificité de chacune d'elle et de moduler leurs interactions avec des partenaires, comme c'est le cas pour la régulation de l'expression de la *G6Pase* (Calon et al., 2007a). De même pour la *Claudine 1*, la partie C-terminale de Cdx2 est nécessaire pour la régulation de sa transcription (Bhat et al., 2012). Néanmoins, la région N-terminale de la protéine CDX2 est également importante pour définir la spécificité d'action puisque cette région est capable d'interagir avec la protéine homéotique de la famille TALE, PBX1, dans les cellules entéroendocrines pour réguler l'expression du gène du Proglucagon (Liu et al., 2006).

## ii. Fonctions non-transcriptionnelles

Enfin, CDX2 exerce également des fonctions non-transcriptionnelles, sans interaction avec l'ADN, et peut agir ainsi sur la prolifération, par exemple, comme c'est le cas pour p27<sup>Kip1</sup>. CDX2 stabilise ce dernier en inhibant sa polyubiquitination et donc sa protéolyse préservant ainsi son rôle au sein de la cellule. Pour cette fonction, c'est l'homéodomaine de CDX2 qui est indispensable (Aoki et al., 2011). Cependant, le mécanisme moléculaire précis n'est pas connu.

CDX2 peut également réguler l'expression de certains gènes, non pas en se fixant sur son promoteur mais en empêchant celle de son activateur. Par exemple, CDX2 inhibe l'activation de la transcription de *Cox2* par NFκB en interagissant avec lui, et en prévenant ainsi sa fixation sur le promoteur de *Cox2* (Mutoh et al., 2007). L'interaction de CDX2 avec un autre facteur de transcription peut aussi conduire à une modulation de la régulation de ces gènes cibles. Ainsi l'interaction entre CDX2 et SMAD3 stimule l'activité transcriptionnelle de ce dernier (Calon et al., 2007b).

De même, CDX2 peut inhiber l'activité de la voie  $\beta$ -caténine/TCF en se fixant à la  $\beta$ -caténine empêchant ainsi la formation du complexe  $\beta$ -caténine/TCF et donc l'activation de la transcription de leurs gènes cibles (Guo et al., 2010).

### e. Fonctions cellulaires de CDX2

Via son activité transcriptionnelle et non-transcriptionnelle, CDX2 impacte sur des fonctions cellulaires importantes.

L'épithélium intestinal est en constant renouvellement ; l'homéostasie et l'intégrité de ce tissu résident dans un équilibre entre la prolifération, différenciation et mort cellulaire. CDX2 a un rôle prépondérant dans le maintien de cet équilibre.

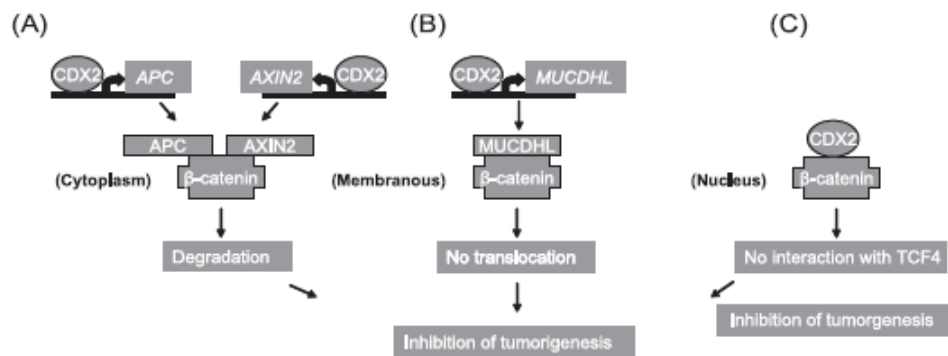
### i. CDX2 et prolifération cellulaire

Afin d'assurer le renouvellement de l'épithélium intestinal, les cellules souches intestinales, situées au fond des cryptes se divisent afin de donner des progéniteurs. Ces derniers se multiplient alors pour accroître leur nombre. Puis leur prolifération s'arrête et les cellules entrent alors dans le processus de différenciation afin de donner les différents sous-types cellulaires. La prolifération des cellules doit être finement régulée : si elle devient incontrôlée, cela peut entraîner le développement de tumeur.

La fonction de CDX2 dans le contrôle de la prolifération cellulaire est encore imparfaitement comprise. La réduction de la prolifération cellulaire dans les cryptes des souris invalidées pour le gène *Cdx2* dans l'intestin adulte indique que ce gène homéotique active de façon directe ou indirecte la prolifération (Stringer et al., 2012). Cependant, le mécanisme d'action est encore inconnu. Cet effet sur la prolifération pourrait représenter un des éléments de la détermination de l'identité intestinale par *Cdx2* puisque cet épithélium se caractérise par son renouvellement cellulaire extrêmement actif.

En revanche, dans des modèles cellulaires cancéreux, CDX2 tend à réduire la prolifération cellulaire (Gross et al., 2008; Lorentz et al., 1997; Suh and Traber, 1996). CDX2 intervient dans le contrôle de cette prolifération en activant ou inhibant la transcription de gènes impliqués dans ce processus. CDX2 a la capacité d'inhiber la voie Wnt, connue pour son rôle prolifératif, via l'inhibition





**Figure 21. Mode d'action de CDX2 sur la voie Wnt.**

CDX2 peut inhiber la voie Wnt par plusieurs axes : activation de la transcription d'*Apc* et de l'*Axin2* (A), de *mucdh1* (B) ou en séquestrant la  $\beta$ -caténine (C) (Olsen et al., 2013).

de la formation du complexe  $\beta$ -caténine/TCF ou en activant la transcription des gènes *Apc*, *Axin2* et *mucdhl* (Fig. 21) (Guo et al., 2010; Hinkel et al., 2012; Olsen et al., 2013). CDX2 contrôle aussi l'expression de gènes impliqués directement dans le cycle cellulaire, tels que *p21* et *p27<sup>Kip1</sup>*, régulateurs de la transition G1/S du cycle. En stimulant leur expression, CDX2 favorise l'arrêt du cycle cellulaire à ce stade (Aoki et al., 2011; Bai et al., 2003). De plus, CDX2 active l'expression du gène *Klf4* agissant comme suppresseur de la prolifération cellulaire (Dang et al., 2001).

## ii. CDX2 et différenciation intestinale

Les progéniteurs intestinaux ont besoin, pour se différencier en chaque type cellulaire intestinal, d'exprimer des gènes spécifiques de l'intestin qui vont conférer aux cellules leurs fonctions et morphologies spécifiques, telles que la polarisation de la cellule, la présence de microvillosités, ou encore l'expression d'enzymes.

Dans cette étape, CDX2 joue un rôle très important puisqu'il contrôle l'expression de bon nombre de ces gènes.

Dans un premier temps, CDX2 influence le devenir des progéniteurs en modulant l'expression d'un gène nécessaire à la ségrégation entre le lignage sécréteur et absorbant, *Math1*. CDX2 stimule l'expression de *Math1* dans les cellules progénitrices de la lignée sécrétrice. Dans la lignée absorbante, cette activation par CDX2 est contrée par l'expression de *Hes1* : les cellules, alors *Math1* négatives, vont se différencier en cellules absorbantes (Mutoh et al., 2006). CDX2 est indispensable pour le développement et la fonctionnalité des entérocytes (Mutoh et al., 2005).

Des expériences cellulaires, dans lesquelles l'expression de *Cdx2* est induite dans les cellules intestinales IEC-6, montrent d'une part le rôle de CDX2 dans l'inhibition de la prolifération mais également dans la différenciation. En effet, l'expression de *Cdx2* dans ces cellules induit des changements morphologiques de la cellule telles que la polarisation, l'apparition de microvillosités et de glycocalyx, mais également l'expression de gènes spécifiques de l'intestin comme la Saccharase Isomaltase (*SI*) (Lorentz et al., 1997; Suh and Traber, 1996). CDX2 régule l'expression du gène codant pour la *Villine*, une protéine de liaison à l'actine importante dans la structure des microvillosités (Yamamichi et al., 2009).

De même, l'ablation de l'expression de *Cdx2* engendre une désorganisation du cytosquelette, une perte des microvillosités ainsi qu'un défaut du trafic endo-lysosomal. Ceci démontre, qu'en plus

de son rôle dans la morphologie cellulaire, CDX2 intervient également dans le transport endosomal des protéines et la formation des lysosomes, notamment via la régulation des protéines Rab11a et Kif3b (Gao and Kaestner, 2010).

En plus de la SI, d'autres enzymes spécifiques du tube digestif sont sous le contrôle de CDX2 telles que la lactase (Fang et al., 2000), CA 1 (Carbonic Anhydrase 1) (Drummond et al., 1998), Guanylylcyclase C (Park et al., 2000).

CDX2 permet l'expression de gènes nécessaires à la fonctionnalité et l'intégrité de l'épithélium intestinal, tels que des transporteurs localisés à la membrane cellulaire : PEPT1 (absorption et transport de petits peptides) (Shimakura et al., 2006) ou encore MDR1 (exportation des drogues et xénobiotiques toxiques) (Takakura et al., 2010). La protéine LI-cadhérine (Liver Intestin Cadherin), protéine de membrane impliquée dans les jonctions cellulaires et assurant le transport des peptides dépendant des protons, est également sous le contrôle de CDX2 (Dantzig et al., 1994; Hinoi et al., 2002).

La surface de l'épithélium est protégée par la sécrétion de mucus, composé de glycoprotéines, par les cellules caliciformes. CDX2 favorise cette protection en stimulant l'expression des gènes *Muc4* (Jonckheere et al., 2007) et *Muc2* (Yamamoto et al., 2003) codant pour des mucines.

### iii. CDX2 et adhésions cellulaires

CDX2 joue également un rôle dans l'adhésion des cellules. En effet, la surexpression de *Cdx2* conduit à l'augmentation de protéines impliquées dans l'adhésion cellules-cellules et cellules-lame basales, telles que l'E-cadhérine (Keller et al., 2004), la sous-unité  $\beta 4$  de l'intégrine, la chaîne  $\gamma 2$  de la laminine, les protéines hémidesmosomales et l' $\alpha$ -actinine (Lorentz et al., 1997) ou encore la Claudine 2, protéine composant les jonctions serrées (Sakaguchi et al., 2002). La LI-cadhérine, avant d'être un transporteur, est surtout une cadhérine calcium-dépendante participant à la jonction entre les cellules et dont l'expression est régulée par CDX2 (Baumgartner, 2013). L'importance de CDX2 dans ces fonctions d'adhésion est confirmée par la perméabilité accrue de la muqueuse intestinale chez les souris hétérozygotes *Cdx2*<sup>+/-</sup> (Calon et al., 2007b).

#### iv. CDX2 et survie cellulaire

Des expériences dans lesquelles la protéine CDX2 est surexprimée en association avec CDX1 montrent que l'apoptose dans ces cellules n'est pas plus importante comparée aux cellules contrôles (Mallo et al., 1998). Cependant, lorsque l'apoptose est induite, par privation en sérum dans le milieu de culture par exemple, les cellules surexprimant *Cdx2* et *Cdx1* sont plus sensibles à cette apoptose induite. De plus, une diminution du facteur anti-apoptotique Bcl-2 est constatée dans les cellules co-surexprimant *Cdx2* et *Cdx1*. CDX2 en coopération avec CDX1 rendent donc les cellules plus sensibles à l'apoptose en régulant négativement l'expression de *Bcl-2*.

De plus, les souris hétérozygotes pour *Cdx2*, soumises à une irradiation par rayonnement  $\gamma$ , présentent une activation plus faible de la *caspase3* (acteur de l'induction de l'apoptose) que les souris sauvages (Bonhomme et al., 2003). La réduction de l'expression de *Cdx2* réduit donc la sensibilité des cellules à l'induction de l'apoptose par irradiation.

Bien que des éléments semblent démontrer une implication de CDX2 dans l'apoptose, aucune étude approfondie n'a, à ce jour, été réalisée afin de confirmer ce rôle et de déterminer son mécanisme d'action.

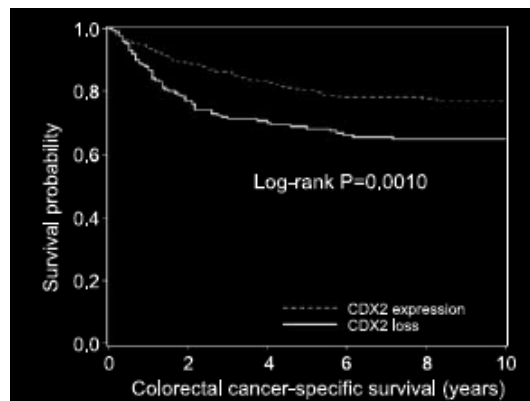
#### f. CDX2 dans les pathologies

Le gène *Cdx2* est normalement exprimé dans l'épithélium intestinal et voit son expression réduite lors de la tumorigenèse de ce tissu. A l'inverse, il existe plusieurs cas pathologiques dans lesquels *Cdx2* est anormalement exprimé de manière ectopique dans des tissus qui ne l'expriment pas dans leur état normal.

##### i. *Cdx2*, un suppresseur de tumeur dans le cancer colorectal

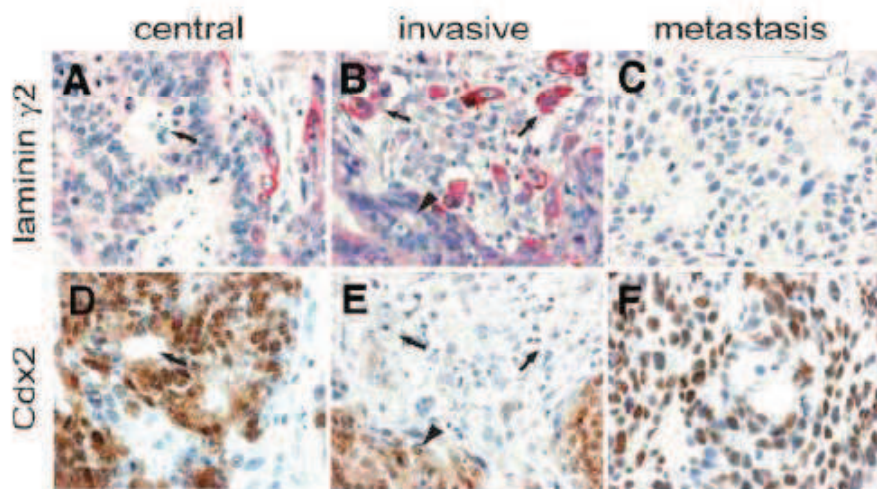
###### ➤ *Cdx2* et CCR

Comme nous l'avons vu dans le paragraphe 4 du premier chapitre, les gènes homéotiques normalement exprimés dans un tissu peuvent voir leur expression altérée lors de sa transformation tumorale. Ceci est également valable pour *Cdx2* dans les CCR où l'expression de *Cdx2* est



**Figure 22. CDX2 réduit la survie des patients atteints d'un CCR.**

La perte d'expression de *Cdx2* dans les CCR réduit la survie des patients atteints de CCR (Baba et al., 2009).



**Figure 23. Expression de *Cdx2* dans un adénocarcinome.**

Immunohistochimie de différentes parties d'un adénocarcinome présentant l'expression de la Laminine- $\gamma$ 2 en rouge (A, B, C) et de CDX2 en brun (D, E, F) dans la partie centrale de la tumeur (A, D), le front invasif (B, E) et dans les métastases (C, F) (Brabletz et al., 2004).

généralement **réduite** et devient **hétérogène** non seulement au sein de la tumeur mais également entre les tumeurs des différents patients.

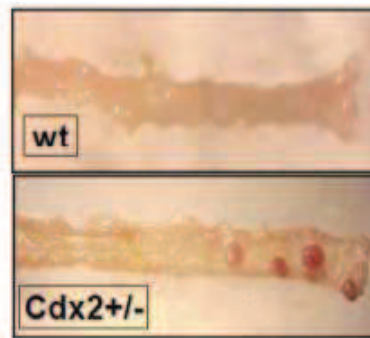
Une forte réduction de l'expression de *Cdx2* est, le plus fréquemment, retrouvée dans les CCR présentant une forte méthylation des îlots CpG des promoteurs, type CIM-High (CpG island methylation-high), plutôt que dans ceux ayant une instabilité chromosomique, MSI-high (Microsatellite Instability-High) (De Sousa E Melo et al., 2013; Kim et al., 2013). La réduction de l'expression de *Cdx2* est corrélée à un stade tumoral plus avancé et de plus haut grade, une tumeur dédifférenciée, la présence de métastases dans les nœuds lymphatiques, un mauvais pronostic et une survie plus faible (Fig. 22) (Baba et al., 2009; Bakaris et al., 2008).

De rares mutations de *Cdx2* sont observées dans les CCR, et quelques réarrangement chromosomiques au niveau du locus de *Cdx2* ont été décrits, cependant, ces réarrangements chromosomiques ne sont pas prédictifs du niveau d'expression de *Cdx2* (da Costa et al., 1999; Subtil et al., 2007). La réduction de son expression passe plutôt par une altération des voies la régulant.

L'hétérogénéité intratumorale peut être liée au processus de dissémination des cellules tumorales qui conduit à la formation de métastases (Fig. 23). En effet, dans les tumeurs différenciées, la partie centrale révèle une expression de *Cdx2*. En revanche cette expression est transitoirement perdue au niveau des cellules du front invasif, s'accompagnant d'une dédifférenciation, d'une surexpression de la *laminine-γ2* et d'une accumulation de la β-caténine au niveau du noyau. Néanmoins, cette réduction de l'expression de *Cdx2* dans les cellules invasives est transitoire, car au niveau des métastases, les cellules expriment à nouveau *Cdx2* et présentent un phénotype similaire à celui de la tumeur primaire (Brabletz et al., 2004).

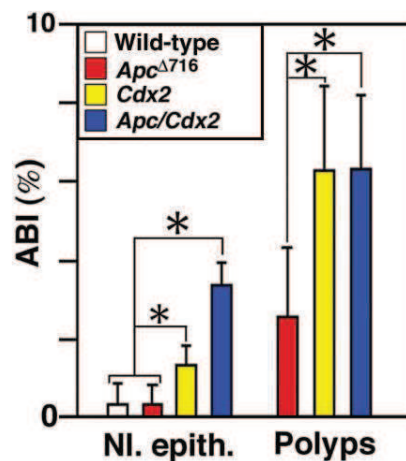
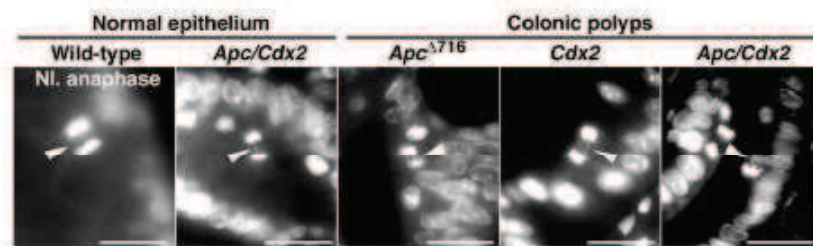
### ➤ *Cdx2* un suppresseur de tumeur

L'ensemble des données histopathologiques et génétiques suggère que *Cdx2* exerce une fonction de suppresseur de tumeurs dans l'intestin. Plusieurs modèles animaux et cellulaires ont été développés pour tester cette hypothèse. Dans un premier temps, les souris hétérozygotes pour *Cdx2* ont été utilisées pour mimer une situation de réduction du niveau d'expression de ce gène. Ces souris développent des lésions intestinales de type hétéroplasie gastrique qui n'évoluent jamais spontanément en CCR (Beck et al., 1999; Bonhomme et al., 2003; Chawengsaksophak et al., 1997). La perte d'un allèle de *Cdx2*, seule, n'est donc pas suffisante pour initier le développement des CCR. Cette observation est renforcée par le fait que les souris invalidées à long terme pour le gène *Cdx2*,



**Figure 24. Les souris  $Cdx2^{+/-}$  sont plus sensibles au développement tumoral.**

Les souris sont traitées à l'azoxyméthane, un agent carcinogène, et analysées après 12 semaines. Les souris  $Cdx2^{+/-}$  présentent des tumeurs dans le côlon distal alors que les souris contrôles n'en n'ont pas (Bonhomme et al., 2003).



**Figure 25. La perte de  $Cdx2$  engendre des anomalies chromosomiques en anaphase.**

L'analyse des cellules en anaphase de l'épithélium du côlon murin révèle la présence de ponts inter-chromosomiques (ABI) dont la fréquence augmente dans les souris  $Cdx2^{+/-}/Apc^{+/\Delta 716}$  (Aoki et al., 2003).

développent des lésions au niveau périécéal définies comme non néoplasiques sur la base de critères histopathologiques (Stringer et al., 2012).

Cependant, dans un modèle de cancérogenèse colique induite par un agent chimique carcinogène, l'azoxyméthane, les souris  $Cdx2^{+/-}$  sont beaucoup plus sensibles au développement tumoral que les souris sauvages. En effet, après 12 semaines de traitement apparaissent des adénocarcinomes au niveau du côlon tandis que de telles lésions n'apparaissent que vers la 25-30<sup>ème</sup> semaine chez les animaux sauvages (Fig. 24). L'épithélium de ces souris, montre également une réduction de sa sensibilité à l'apoptose induite par les irradiations  $\gamma$ , comparé au sauvage (Bonhomme et al., 2003). Ceci dénote un rôle de  $Cdx2$  dans la régulation de l'apoptose des cellules intestinales.

Ces résultats sont corroborés par ceux obtenus dans un autre modèle murin. Dans ce cas, les souris hétérozygotes pour  $Cdx2$  ont été placées dans un contexte génétique induisant le développement spontanée de tumeurs intestinales ( $Apc^{+/\Delta716}$ ). Cette double modification génétique (souris  $Cdx2^{+/-}/Apc^{+/\Delta716}$ ) a pour conséquence un développement spontané accru du nombre de polypes adénomateux au niveau du côlon distal des doubles mutants comparé aux souris  $Apc^{+/\Delta716}$ . Dans ces tumeurs, une dérégulation du cycle cellulaire est observée : la réduction de l'expression de  $Cdx2$  induit une diminution de la phase G1 et une accélération de la phase S, via la voie mTor, ce qui conduit à l'apparition de pont entre les chromosomes en anaphase, augmentant ainsi l'instabilité chromosomique et le risque de générer des mutations et translocations oncogéniques (Fig.25) (Aoki et al., 2003).

L'ensemble de ces résultats montre donc que l'altération de  $Cdx2$  n'induit pas l'initiation tumorale, mais que la réduction de son expression favorise la progression tumorale en jouant sur l'apoptose, le cycle cellulaire et la stabilité génomique.

Outre le rôle de CDX2 dans la tumeur primaire, la réduction de son expression dans les cellules du front invasif de la tumeur a également un effet sur le processus métastatique (Gross et al., 2008). En effet, dans des modèles cellulaires en culture, la réduction de l'expression de  $Cdx2$  augmente leur pouvoir migratoire des cellules cancéreuses coliques, tandis que la restauration d'un niveau élevé de  $Cdx2$  réduit leur capacité de migration. De plus, la restauration de son expression réduit la dissémination des cellules cancéreuses coliques dans un modèle *in vivo* de xénogreffe chez la souris « nue ».  $Cdx2$  s'oppose donc au processus de dissémination de la tumeur et ainsi à la formation de métastases (Gross et al., 2008).



L'expression de *Cdx2* est hétérogène et réduite au sein des tumeurs colorectales. Cette perte d'expression a pour conséquences de favoriser la tumorigenèse et la formation des métastases. ***Cdx2* exerce donc une fonction de suppresseur de tumeur dans le tissu où il est exprimé physiologiquement : l'épithélium intestinal.**

### ii. *Cdx2* et maladies inflammatoires de l'intestin

Les maladies inflammatoires de l'intestin dont les plus fréquentes sont la **colite ulcéreuse** et la **maladie de Crohn**, sont des inflammations chroniques de l'intestin. Les patients atteints de ces maladies présentent des diarrhées, douleurs abdominales, une perte de poids et ont un risque accru de développer un CCR. *Cdx2* est impliqué dans le développement de ces maladies. Son expression est réduite par une cytokine proinflammatoire, le TNF $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor) (Kim et al., 2002; Coskun et al., 2011; Coskun et al., 2014). Etant donné le rôle de CDX2 dans la régulation de l'adhésion cellulaire, la perte de son expression déstabilise la barrière épithéliale, augmentant ainsi sa perméabilité (Calon et al., 2007b). De plus, cette réduction de *Cdx2* entraîne la levée de l'inhibition de *Cox2*, une enzyme proinflammatoire, par *Cdx2* (Kim et al., 2004; Mutoh et al., 2007). Ainsi, les souris hétérozygotes *Cdx2*<sup>+/-</sup> sont plus sensibles que les souris sauvages à la rectocolite expérimentale induite par le traitement avec du DSS (Dextran Sodium Sulfate) (Calon et al., 2007b).

### iii. *Cdx2* et métaplasies intestinales

Les métaplasies sont des **transdifférenciations** d'un type tissulaire en un autre chez l'adulte, liées à un processus pathologique. Les métaplasies intestinales de l'estomac (Barros et al., 2012; Song et al., 2013) ou de l'œsophage (Laßmann and Werner, 2014) sont souvent accompagnées d'une expression ectopique de *Cdx2* normalement non exprimé dans ces deux organes. Dans le cas de ces métaplasies intestinales, le tissu d'origine se transforme et prend alors les caractéristiques aussi bien morphologiques que moléculaires du tissu intestinal.

L'expression ectopique de *Cdx2* entraîne l'activation de ses gènes cibles typiques de l'intestin, tels que *Muc2* ou la *Villine*. Ceci engendre la différenciation du tissu en type intestinal (Sakamoto et al., 2011). L'utilisation de souris transgéniques dans lesquelles l'expression ectopique de *Cdx2* au niveau de l'estomac engendre la transdifférenciation du tissu en métaplasie intestinale, démontre que l'expression de *Cdx2* à elle seule suffit pour donner une identité intestinale à un

épithélium d'origine endodermique monostratifié (Mutoh et al., 2002; Silberg et al., 2002). Cependant, l'expression ectopique de *Cdx2* dans l'épithélium squameux de l'œsophage chez des souris transgéniques ne provoque que des modifications phénotypiques mineures n'atteignant pas le stade de la métaplasie (Kong et al., 2011a). Ce qui suggère que la transformation phénotypique induite par l'expression de *Cdx2* dépend également du contexte cellulaire et/ou morphologique par un mécanisme qui reste encore à élucider.

Les métaplasies intestinales de l'estomac ou de l'œsophage sont considérées comme des **lésions précancéreuses** conduisant à des adénocarcinomes gastriques ou œsophagiens. Ceci suggère que *Cdx2*, inducteur des métaplasies, pourrait exercer un **rôle oncogénique** dans ces lésions. En faveur de cette hypothèse, Mutoh et al. ont rapporté l'évolution des métaplasies en adénocarcinomes dans un modèle transgénique exprimant *Cdx2* dans l'estomac ; cependant, cette observation n'a pas été confirmée dans le modèle développé par Silberg et al. De plus, plusieurs études montrent que l'expression ectopique de *Cdx2* dans l'estomac diminue au stade adénocarcinome par rapport au stade des métaplasies et que l'importance de cette réduction est un facteur de mauvais pronostic (Park et al., 2010; Seno et al., 2002; Xin et al., 2007; Zhang et al., 2009). Une fois le processus cancéreux engagé au niveau des métaplasies intestinales de l'estomac ou de l'œsophage, *Cdx2* pourrait donc jouer le rôle d'un gène suppresseur de tumeurs, comme dans le côlon.

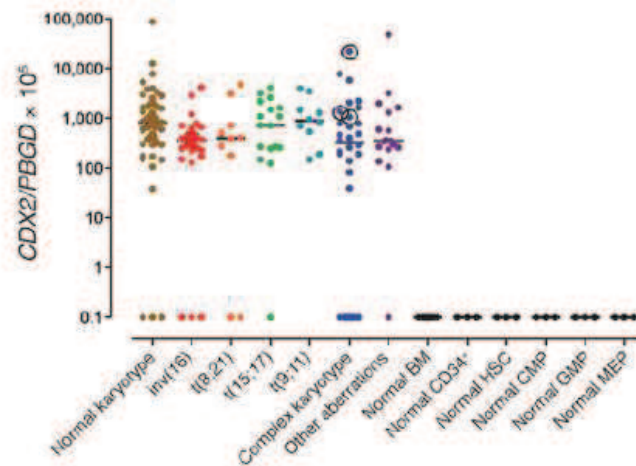
#### iv. *Cdx2*, un oncogène dans les leucémies aiguës

##### ➤ *Cdx2* dans les leucémies aiguës

L'expression ectopique de *Cdx2* est également retrouvée dans un autre type de pathologie : il s'agit des cancers affectant le sang, les **leucémies**.

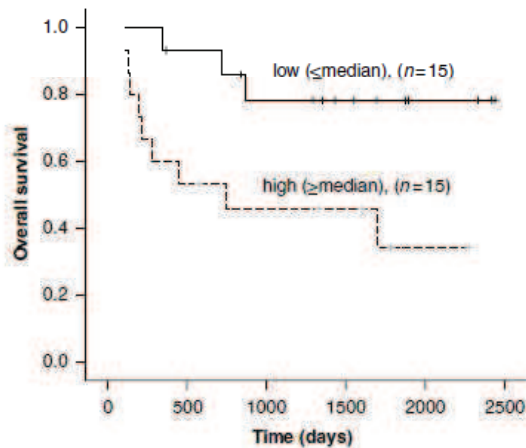
L'hématopoïèse est le processus par lequel les cellules souches hématopoïétiques prolifèrent et se différencient pour donner les différents types cellulaires composant le sang : la lignée myéloïde conduisant aux globules rouges, plaquettes, et cellules immunitaires telles que les neutrophiles, éosinophiles et monocytes, et la lignée lymphoïdes donnant les cellules immunitaires telles les lymphocytes et cellules NK (Natural Killer).

Les leucémies sont la conséquence de la dérégulation de ce processus entraînant la prolifération non contrôlée et indifférenciée de progéniteurs d'un type cellulaire sanguin. Il existe



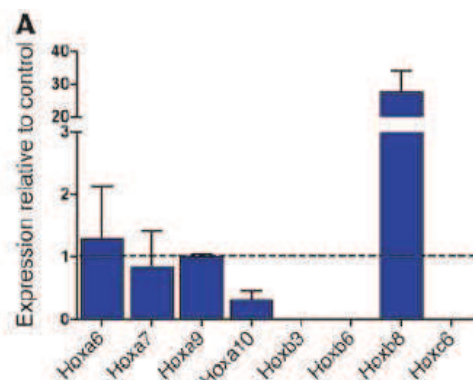
**Figure 26. Expression de *Cdx2* dans les leucémies myéloïdes aiguës.**

Expression de *Cdx2* dans des leucémies myéloïdes aiguës de différents caryotypes comparée à celle des cellules hématopoïétiques saines (Scholl et al., 2007).



**Figure 27. CDX2 réduit la survie des patients atteints de leucémie aiguë.**

Une expression élevée de *Cdx2* dans les leucémies réduit la survie des patients comparée à ceux ayant une faible expression (Thoene et al., 2009).



**Figure 28. Dérégulation des gènes *Hox* par CDX2.**

Expression relative de différents gènes *Hox* dans des cellules hématopoïétiques murines surexprimant *Cdx2* (Scholl et al., 2007).

deux grands types de leucémies suivant les progéniteurs touchés : les leucémies myéloïdes et les leucémies lymphoïdes. Elles peuvent être soit chroniques soit aiguës.

L'expression ectopique de *Cdx2* est observée dans plus de 80% des leucémies aiguës, qu'elles soient lymphoïdes ou myéloïdes et sans caryotype prédéfini (Fig. 26). La présence de CDX2 dans les leucémies est un facteur de mauvais pronostic et les patients présentent un taux de survie plus faible que ceux atteints de leucémies négatives pour *Cdx2* (Fig. 27) (Thoene et al., 2009).

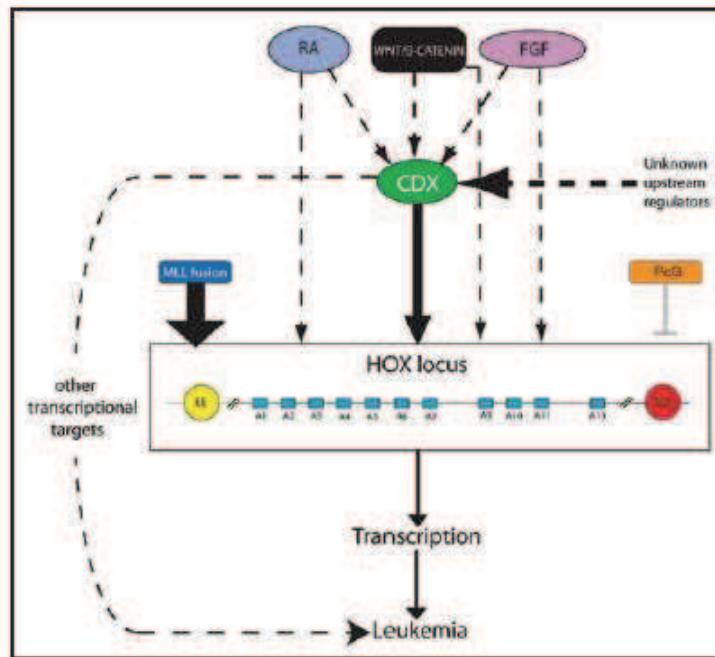
Les leucémies sont caractérisées par de nombreuses translocations chromosomiques et une dérégulation de nombreux gènes *Hox* induite par CDX2 (Fig. 28) (Fröhling et al., 2007; Scholl et al., 2007; Thoene et al., 2009). *Cdx2* n'est pas exprimé dans les leucémies de type chronique et joue un rôle prépondérant dans l'émergence de la phase aiguë de la maladie.

L'expression ectopique de *Cdx2* est rarement due à une mutation génétique ou translocation chromosomique. Une seule translocation impliquant la région chromosomique de *Cdx2* et celle du gène *ETV6* a été décrite : t(12;13)(p13;q12). Elle engendre l'expression d'une protéine de fusion ETV6-CDX2. Cependant, ce n'est pas cette fusion qui confère une fonction leucémogène à CDX2 mais bien l'expression ectopique de *Cdx2* provenant de l'autre allèle intact (Rawat et al., 2004). Ceci démontre que l'expression ectopique et le pouvoir leucémogène de *Cdx2* ne sont pas dus à des mutations mais bien à la dérégulation des voies contrôlant son expression. Le mécanisme régissant l'activation du locus de *Cdx2* reste inconnu. En revanche, les mécanismes d'action de CDX2 dans l'émergence des leucémies aiguës impliquent d'une part une dérégulation de gènes *Hox* (Rawat et al., 2008) et d'autre part, une répression de *Klf4* et une dérégulation de la signalisation induite par PPAR $\gamma$  (Faber et al., 2013).

### ➤ ***Cdx2* un oncogène**

Dans les leucémies aiguës, *Cdx2* est exprimé de manière ectopique. **Dans cette situation, *Cdx2* exerce-t-il un rôle oncogénique ?**

Des expériences, *in vivo*, suggèrent le pouvoir oncogénique de *Cdx2* dans la lignée hématopoïétique. Des souris irradiées afin de détruire leur moelle osseuse puis transplantées avec des cellules hématopoïétiques surexprimant *Cdx2*, développent des leucémies myéloïdes aiguës et meurent plus rapidement comparées aux souris contrôles. Ces données extrêmement intéressantes doivent cependant être pondérées en raison de la nature du modèle utilisé. En effet, il s'agit d'un



**Figure 29. Régulation des gènes *Hox* dans les leucémies aiguës.**

La surexpression de *Cdx2* entraîne la dérégulation des gènes *Hox* conduisant au développement leucémique (Frohling et al., 2007).

modèle de réimplantation cellulaire après irradiation des cellules souches de la moelle osseuse. Ce modèle diffère donc par deux aspects importants de la pathologie humaine : premièrement, l'induction de la surexpression de *Cdx2* ne se produit pas dans le contexte de la niche des cellules souches hématopoïétiques ; deuxièmement, la réimplantation cellulaire implique l'administration massive d'un très grand nombre de cellules modifiées sans compétition avec les cellules hématopoïétiques endogènes normales.

L'inhibition de l'expression de *Cdx2* dans des lignées leucémiques en culture réduit leur croissance et leur pouvoir clonogénique. Ceci suggère donc que CDX2 a une action sur la prolifération des cellules hématopoïétiques et y exerce une action leucémogène (Scholl et al., 2007). De plus, CDX2 a la capacité de moduler le destin des progéniteurs hématopoïétiques (Lengerke and Daley, 2012).

Les gènes *Hox* sont très importants pour le développement de la lignée hématopoïétique. Une dérégulation de leur expression est une des caractéristiques des leucémies. CDX2 est un des facteurs responsables de ce profil d'expression aberrant. Par exemple, CDX2 entraîne la surexpression de gènes *Hox* pouvant induire le développement de leucémies tels que *Hoxb8*. Ce pouvoir leucémogène de CDX2, passant par la dérégulation de gènes *Hox*, nécessite son domaine transcriptionnelle en N-terminale (Fig. 29) (Rawat et al., 2008).

Etant donné que l'expression ectopique de *Cdx2* dans la lignée hématopoïétique engendre une plus forte prolifération des cellules ainsi que leur transformation, ***Cdx2* est considéré comme un oncogène dans ce tissu où il n'est pas exprimé physiologiquement.**

### g. Dualité de fonctions de CDX2

De plus en plus de travaux démontrent que dans le monde vivant tout n'est pas noir ou blanc mais qu'il peut être les deux à la fois. Ainsi, un suppresseur de tumeur peut s'avérer être également un oncogène dans certains cas. Par exemple, *Nkx2-1* (appartenant à la classe des gènes homéotiques NKL) possède cette dualité, tant oncogène que suppresseur de tumeur suivant le contexte cellulaire (Homminga et al., 2012; Winslow et al., 2011).

L'implication d'un gène dans le développement de pathologies telles que les cancers peut être de deux ordres :

- La perte de l'expression normale ou la mutation entraînant une perte de fonction du gène au cours de la tumorigenèse du tissu ; dans ce cas-là le gène homéotique semble se comporter comme un **suppresseur de tumeur**.
- L'expression anormale du gène dans la tumeur par surexpression, expression ectopique, mutation ou translocation activatrice ; dans cette configuration, le gène homéotique semble agir en tant qu'**oncogène**.

*Cdx2* est normalement exprimé dans l'épithélium intestinal et son expression est perdue dans les CCR. ***Cdx2* y exerce une fonction de suppresseur de tumeur.**

A l'inverse, dans des cas pathologiques tels que les métaplasies intestinales et les leucémies aiguës, une expression ectopique de *Cdx2* est observée alors que dans le tissu sain il n'y est pas présent. ***Cdx2*, dans le cas d'expression ectopique, pourrait agir comme un oncogène.**

*Cdx2* n'étant pas (ou rarement) muté dans les leucémies, ceci ne peut expliquer les fonctions opposées de *Cdx2*. Plusieurs hypothèses peuvent être émises pour expliquer cette dualité de fonction :

- **Des modifications post-traductionnelles de la protéine** : différentes suivant la lignée, elles peuvent moduler l'activité transcriptionnelle de *Cdx2* et la spécificité de ses cibles dans les deux lignées.
- **Des partenaires différents** : CDX2 agit sur certaines de ses cibles en coopération avec d'autres facteurs, dont la présence ou non dans les deux lignées pourrait moduler l'activité de CDX2.
- **Des modifications épigénétiques** : une méthylation différentielle de l'ADN et donc de son accessibilité peut aussi expliquer que CDX2 n'active pas les mêmes gènes suivant la lignée.

Cette question reste ouverte et constitue la base de mon travail de thèse.

Un exemple de cette action opposé de CDX2, entre la lignée cancéreuse colique et leucémique, est la régulation de l'expression du gène *Klf4*. *Klf4* est un suppresseur de tumeur, il induit l'arrêt du cycle cellulaire et stimule l'apoptose et la différenciation cellulaire. Alors que CDX2 stimule sa transcription dans les cellules intestinales, il la réprime dans les cellules leucémiques. Cette différence est la résultante d'une fixation de CDX2 sur deux sites différents du promoteur.

L'accessibilité d'un site par rapport à l'autre peut être due à des inégalités de méthylation dans chacune des lignées (Faber et al., 2013; Rouhi and Fröhling, 2013). Dans ce cas, l'épigénétique semble être responsable de la spécificité d'action de *Cdx2* dans un tissu.

Au cours de ma thèse, j'ai pu mettre en évidence un rôle de CDX2 sur la réparation des cassures de l'ADN par le mécanisme du NHEJ (Non Homologous End Joining). Ce rôle est différent dans chacune des lignées.

#### **h. Régulation de l'expression et de l'activité de *Cdx2***

Les profils d'expression et les fonctions de *Cdx2* sont complexes, ce qui suggère que ce gène homéotique est régulé de manière très précise. Les mécanismes et les facteurs de régulation de *Cdx2*, tant physiologiques que dans les pathologies, ne sont encore que partiellement élucidés.

#### **i. Régulation transcriptionnelle du gène *Cdx2***

La transcription du gène *Cdx2* est finement régulée, permettant son expression bien précise et dans des domaines anatomiques spécifiques, notamment au cours de l'embryogenèse. La région promotrice de 5kb, en amont du site d'initiation de la transcription, est importante pour son expression dans la partie postérieure de l'embryon au moment de la gastrulation. Son expression se restreint ensuite à l'épithélium intestinal, et pour cela, nécessite des séquences promotrices situées à 8-9kb en amont du site de début de transcription, comprenant notamment des sites de fixation pour les facteurs HNF4 $\alpha$ , GATA6, Tcf4/ $\beta$ -caténine. Ces facteurs se fixent sur le promoteur de *Cdx2* et activent sa transcription au niveau intestinal (Benahmed et al., 2008; Boyd et al., 2009).

Le microenvironnement de la cellule, au niveau de l'intestin, joue également un rôle dans la régulation de l'expression de *Cdx2* (Benahmed et al., 2007). L'activité du promoteur de *Cdx2* est stimulée par le butyrate de sodium, molécule issue de la fermentation des fibres alimentaires par la flore intestinale (Domon-Dell et al., 2002). De même, les cellules stromales, sous l'influence du calcium et donc de leurs récepteurs CaSR (Calcium-sensing Receptor), sécrètent le facteur Wnt5a qui agit alors de manière paracrine sur les cellules de l'épithélium intestinal et stimule l'expression de *Cdx2* (Pacheco and Macleod, 2008). La Laminine-1, protéine de la matrice extracellulaire au niveau de la lame basale, a également un pouvoir stimulateur sur l'expression de *Cdx2* (Lorentz et al., 1997).



Enfin, une autre molécule de la matrice extracellulaire, le collagène de type I, a quant à elle, un effet inhibiteur sur l'expression de *Cdx2* via l'intégrine- $\beta$ 1 (Brabletz et al., 2004).

Dans les cancers colorectaux, *Cdx2* est réprimé par des voies oncogéniques activées dans les CCR telles que la voie Raf-Mek-ERK 1/2, Ras et PI3K (Kim et al., 2002; Krueger et al., 2009; Lorentz et al., 1999). La voie Wnt, indirectement, intervient également dans l'inhibition de l'expression de *Cdx2* et l'état indifférencié des cellules via l'intermédiaire de SOX9 : le complexe  $\beta$ -caténine/TCF4 active la transcription de *Sox9* qui va à son tour réprimer l'expression de *Cdx2* (Blache et al., 2004). A l'inverse, la perte de HNF4 $\alpha$ , qui se comporte comme un suppresseur de tumeur dans les CCR, est corrélée à la perte d'expression de *Cdx2*, suggérant une régulation de *Cdx2* par HNF4 $\alpha$  (Saandi et al., 2013).

Lors de la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT), une corrélation est observée entre l'augmentation de l'expression des protéines Snail et Slug (facteurs de l'EMT) et la réduction de l'expression de *Cdx2*, *in vitro*. Ces protéines induisent une diminution de l'activité de promoteur de *Cdx2* (Gross et al., 2008).

Dans les métaplasies de l'œsophage, il a été démontré que les acides biliaires remontés par les reflux gastro-œsophagiens peuvent stimuler son expression (Kazumori et al., 2006). Les métaplasies intestinales gastriques, quant à elles, sont souvent induites par une infection par *Helicobacter pylori*. Après l'infection, des éléments de la voie des BMP/SMAD et plus particulièrement BMP2 et 4, sont surexprimés dans les cellules. Ces deux molécules régulent alors positivement le gène *Cdx2* via une région de 9,3kb de son promoteur et induisent le développement de la métaplasie (Barros et al., 2008). De plus, l'interaction entre CDX2 et la forme phosphorylée de SMAD est essentielle pour la transformation du tissu en un type intestinal (Mari et al., 2014).

Au niveau des cancers gastriques l'expression de *Cdx2* est réprimée par la méthylation de son promoteur par l'enzyme DNMT1 (DNA MethylTransferase) qui est surexprimée dans certains cancers gastriques (Zhang et al., 2013). Il existe également un rétrocontrôle de l'expression de *Cdx2* par lui-même. En effet, CDX2 est capable de se fixer sur son promoteur et ainsi réguler sa propre expression dans l'estomac (Barros et al., 2011; Xu et al., 1999).

## ii. Régulation post-transcriptionnelle de *Cdx2*

L'expression de *Cdx2* est également régulée au niveau post-transcriptionnel. En effet, la protéine de la famille des RBPs (RNA-binding Protein), Mex3A, peut moduler la quantité de CDX2 de la cellule en se fixant sur la partie 3' non codante de son ARN messenger. Mex3A, réprime donc la traduction de l'ARNm de *Cdx2*, inhibant ainsi son expression. De ce fait, Mex3A a un impact sur l'homéostasie et la différenciation intestinale. Ainsi, une expression dérégulée et accrue de Mex3a peut favoriser le développement tumoral (Buchet-Poyau et al., 2007; Pereira et al., 2013).

Les microARNs (miARN) sont des ARNs de petites tailles (19 à 25 paires de bases) qui ont la capacité de réguler l'expression de gènes en se fixant sur la partie 3'UTR des ARNm entraînant leur dégradation. Plusieurs miARNs régulant l'expression de *Cdx2* ont été découverts. Dans la progression de l'œsophage de Barrett vers le développement d'un adénocarcinome, les acides biliaires induisent l'expression des miARNs-221 et -222 régulant l'expression de *Cdx2* indirectement en ciblant son régulateur *p27<sup>Kip1</sup>* (Matsuzaki et al., 2013). Les hormones thyroïdiennes déclenchent l'expression de miARN-181d qui inhibe l'expression de *Cdx2* dans les cellules hépatiques (Yap et al., 2013). Les miARN-9, -16, et -22 sont induits par l'expression de *Cdx1* (Tagawa et al., 2012). Par ce biais, CDX1 peut donc réguler post-transcriptionnellement l'expression de *Cdx2*.

## iii. Régulation post-traductionnelle CDX2

Le niveau d'expression d'une protéine peut également être régulé de manière post-traductionnelle en jouant sur la stabilité et la demi-vie de cette protéine. La phosphorylation de CDX2, au niveau d'un motif composé de quatre sérines dans sa partie C-terminale, est responsable de sa dégradation. En effet, ce motif est un site de phosphorylation par des kinases telles qu'Erk1/2 et CDK2 (Cyclin Dependent Kinase 2). Ceci constitue un signal de poly-ubiquitination qui entraîne la dégradation par le protéasome (Gross et al., 2005; Krueger et al., 2009). *p27<sup>Kip1</sup>*, un inhibiteur du cycle cellulaire, a la capacité de se fixer à CDX2 et d'empêcher ainsi sa phosphorylation par CDK2. Ceci permet de stabiliser la protéine et d'inhiber sa dégradation, notamment dans les cellules différenciées des cryptes (Boulanger et al., 2005). Cette interaction régule en même temps la stabilité de *p27<sup>Kip1</sup>* (Aoki et al., 2011).

#### iv. Régulation de l'activité de CDX2

Enfin, un autre moyen de jouer sur l'activité de CDX2, autre que de modifier son niveau d'expression dans la cellule, est de moduler directement son activité. Dans les cellules différenciées, MAPK p38 est capable de se fixer à CDX2 et de la phosphoryler, au niveau de son domaine de transactivation. Contrairement à la phosphorylation dans la partie C-terminale de CDX2, celle-ci n'entraîne pas une dégradation de la protéine mais augmente l'activité transcriptionnelle sur ces gènes cibles, participant ainsi à la différenciation cellulaire intestinale (Houde et al., 2001). A l'inverse, dans les cellules en prolifération des cryptes, la phosphorylation de la sérine S60 du domaine de transactivation de CDX2, par la voie des MAPKs, inhibe son activité transcriptionnelle (Rings et al., 2001).

Par ce mécanisme, dans l'épithélium intestinal, tout en gardant le même niveau d'expression de *Cdx2*, CDX2 peut avoir différents effets dans les différentes zones. Ainsi, dans les cellules proliférantes et peu différenciées, à la base des cryptes, l'activité de différenciation de CDX2 est réprimée alors que dans le haut des cryptes, là où les cellules commencent à se différencier, l'activité de CDX2 est stimulée afin de permettre l'expression des gènes de différenciation intestinale.

Ceci montre une régulation fine de l'expression de *Cdx2* et de son activité en fonction de la localisation cellulaire et par plusieurs voies. Une dérégulation d'une de ces voies peut entraîner une altération de l'expression de *Cdx2* et ainsi avoir des conséquences dramatiques pour la cellule, telle que la transformation tumorale.

### 3. Le gène *Hoxb7*

#### A. *Hoxb7* et son expression normale

*Hoxb7*, tout comme *Cdx2* appartient à la classe ANTP de la famille des gènes homéotiques (Holland et al., 2007). Il est composé d'un **domaine de transactivation** en N-terminal, d'un **homéodomaine** et d'une courte partie **C-terminale**.

*Hoxb7* intervient au cours du développement embryonnaire pour la mise en place des axes de l'embryon. Son expression débute au niveau de l'allantoïde pour apparaître ensuite dans la partie

postérieure de la ligne primitive. L'expression de *Hoxb7* s'étend ensuite le long de celle-ci vers la partie antérieure de l'embryon où il finira par s'exprimer au niveau du mésoderme somitique et du neurectoderme (Deschamps and Wijgerde, 1993; Deschamps et al., 1987; Kress et al., 1990). Au cours du développement embryonnaire, contrairement à certains gènes *Hox* (*Hoxa13*, *Hoxd13*), l'expression de *Hoxb7* n'est pas altérée par la perte de l'expression de *Cdx2* dans un modèle murin d'inactivation conditionnelle pour *Cdx2*. *Hoxb7* n'est donc pas régulé par CDX2 chez l'embryon (Gao et al., 2009).

Chez l'adulte, HOXB7 participe à la prolifération et à la différenciation hématopoïétique (Carè et al., 1999) ainsi qu'au développement de la glande mammaire (Srebrow et al., 1998).

## B. *Hoxb7* et cancer

Une surexpression de *Hoxb7* est décrite dans bon nombre de cancers tels que les leucémies, les myélomes, les cancers du sein, de l'ovaire, du poumon ou encore du pancréas. La surexpression de *Hoxb7* dans les cancers oraux est associée à un mauvais pronostic ; elle y entraîne une prolifération accrue des cellules tumorales (De Souza Setubal Destro et al., 2010). Dans les tumeurs mammaires, HOXB7 induit l'expression de protéines mésenchymateuses, comme par exemple la Vimentine, et la perte d'expression de protéines épithéliales telle que la Claudine, permettant aux cellules d'acquérir un pouvoir migratoire et invasif typique de la transition épithélio-mésenchymateuse (Wu et al., 2006). Il favorise ainsi la dissémination de la tumeur et la formation de métastases, notamment au niveau du poumon (Chen et al., 2008). HOXB7 permet également l'expression de facteurs proangiogéniques tels que le VEGF ou l'angiopoïétine-2 induisant ainsi l'angiogenèse (Carè et al., 2001). Dans le cas des tumeurs du sein positives pour HER-2, *Hoxb7* joue un double rôle : dans le modèle murin surexprimant *Hoxb7* et *HER-2* dans la glande mammaire, HOXB7 inhibe l'initiation de la tumeur. Cependant, si une tumeur s'est développée, HOXB7 va à l'inverse stimuler sa progression et la formation de métastases (Chen et al., 2008). Dans le cas des tumeurs du sein positives pour le récepteur aux oestrogènes, HOXB7 confère une résistance aux traitements aux cellules cancéreuses via l'activation du promoteur EGFR (Jin et al., 2012).

La surexpression de *Hoxb7* dans les progéniteurs hématopoïétiques engendre une augmentation de leur prolifération mais stimule également la différenciation myéloïde (Carè et al., 1999). *Hoxb7* est également impliqué dans l'œsophage de Barrett, dans lequel il est surexprimé par

l'intermédiaire de modifications épigénétiques de son promoteur. HOXB7 induit l'expression de marqueurs intestinaux tels que *Muc2* ou la *Villine* (di Pietro et al., 2012).

En résumé, *Hoxb7* est **surexprimé** dans de nombreux cancers où il est un facteur de mauvais pronostic. Il favorise la prolifération tumorale, sa croissance et sa dissémination en permettant l'expression de gènes impliqués dans l'EMT et l'angiogenèse. **Ceci confère donc à *Hoxb7* une fonction d'oncogène.**

Dans le cancer du côlon, une surexpression de *Hoxb7* est aussi observée (Liao et al., 2011). Elle est également signe d'une tumeur agressive réduisant la survie des patients. HOXB7 favorise la prolifération ainsi que la croissance tumorale notamment en stimulant l'expression de gènes tels que la *cycline D1* et en inhibant  $p27^{Kip1}$ , régulateurs du cycle cellulaire. Alors que CDX2 stabilise  $p27^{Kip1}$ , HOXB7 l'inhibe, cette opposition entre ces deux protéines conduit notamment à leur effet divergeant sur la prolifération. ***Hoxb7* agit donc également en tant qu'oncogène dans les CCR.**

Contrairement à *Cdx2*, *Hoxb7* est donc surexprimé dans les CCR et agit comme oncogène. Deux protéines de la même famille exercent donc deux rôles opposés dans un même type cellulaire. Cette dualité constitue la base de la deuxième partie de mon travail de thèse visant à élucider les mécanismes par lesquels ces deux protéines jouent leurs rôles opposés.

### C. HOXB7 et le C-NHEJ

Les cellules épithéliales du sein sont transformées par l'expression ectopique de *Hoxb7*, conférant aux cellules la capacité de croître et former des colonies, *in vitro*, dans un milieu appauvri. De plus, ces cellules sont résistantes aux radiations ionisantes. Cette résistance est notamment acquise grâce à l'interaction de HOXB7 avec les protéines de réparation impliquées dans le NHEJ, KU70/80 et DNA-PKcs, via la troisième hélice de son homéodomaine. De ces interactions en résulte une stimulation de l'activité de réparation des cassures double-brins, notamment en activant l'activité de l'holoenzyme DNA-PK, rendant ainsi les cellules résistantes aux agents endommageant l'ADN (Rubin et al., 2007).

En stimulant la réparation des cassures de l'ADN, HOXB7 augmente le risque d'insertion d'erreurs dans l'ADN et de translocations chromosomiques pouvant conduire à la transformation cellulaire et au développement tumoral. Ceci constitue donc un mode d'action supplémentaire pour son rôle d'oncogène.

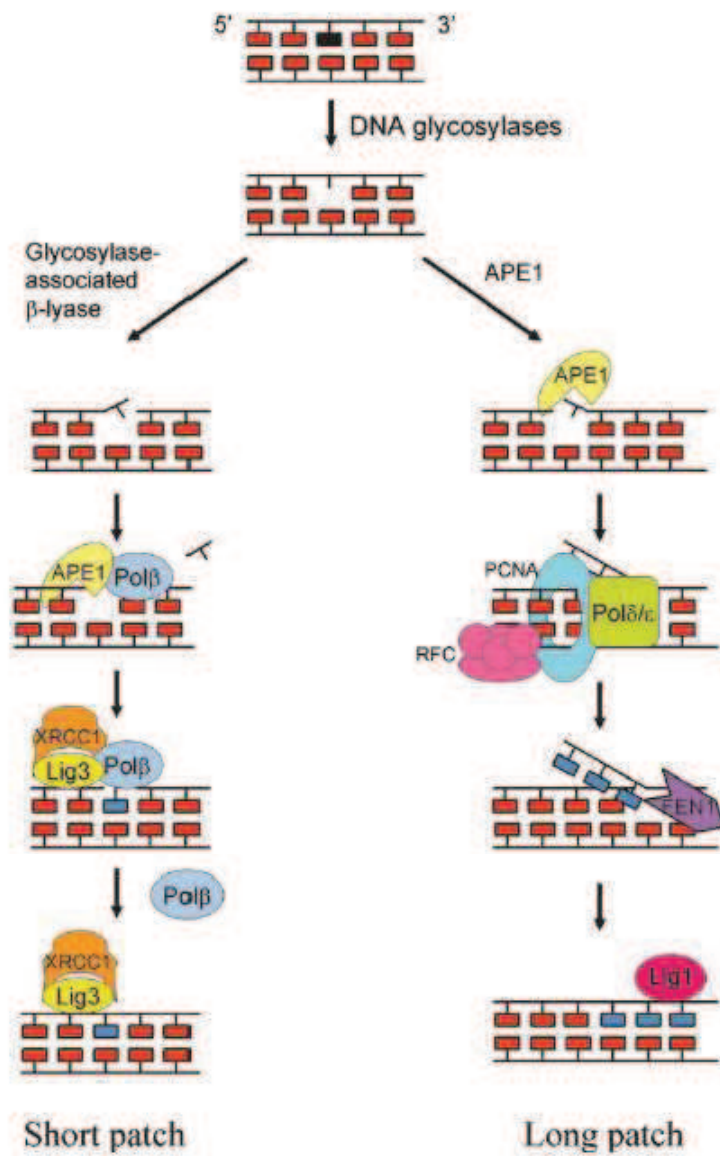
## Chapitre III : *La réparation de l'ADN*

L'intégrité du génome est menacée quotidiennement. Il doit faire face aux attaques des radiations ionisantes et solaires mais également aux expositions à des agents chimiques présents dans notre environnement. Ces menaces peuvent entraîner la survenue de modifications des bases nucléiques, ou bien de cassures simple-brin ou double-brins de l'hélice d'ADN. A cela, la machinerie cellulaire n'étant pas infaillible, il faut ajouter les erreurs commises lors de la réplication de l'ADN. Chez les mammifères, il est estimé à 10 000 le nombre d'évènements modifiant l'ADN survenant par heure dans une cellule (Moustacchi, 2000).

Normalement, si l'intégrité du génome est atteinte, la cellule déclenche le processus de mort par apoptose. Dans le cas des lésions de l'ADN, le suppresseur de tumeur *p53* sera activé par sa dissociation de son régulateur MDM2 et va engager la cellule soit vers un arrêt du cycle cellulaire pour lui laisser le temps de réparer, soit vers l'apoptose si la réparation ne peut pas se faire (Fridman and Lowe, 2003). Dans les cancers, le gène *p53* est le gène le plus couramment inactivé, ce qui a pour conséquence un défaut du contrôle du cycle cellulaire, de la sénescence et de l'apoptose ainsi qu'une dérégulation des mécanismes de réparation de l'ADN (Hussain and Harris, 1998; Smith and Seo, 2002; Soussi and Bérout, 2003). Une dérégulation de l'apoptose, tout comme une mauvaise réparation, peut induire l'apparition de réarrangements, de délétions chromosomiques et de mutations pouvant, à leur tour, conduire à la transformation de la cellule et au développement tumoral.

Il existe différents modes de réparation de l'ADN suivant le type de lésion, pouvant être regroupés en deux grands groupes :

- **La réparation fidèle** dite « error-free » parmi lesquelles le BER (Base Excision Repair), le NER (Nucleotide Excision Repair), le MMR (MisMatch Repair) et la Recombinaison Homologue (HR).
- **La réparation infidèle** dite « error-prone » qui correspond au NHEJ (Non Homologous End Joining).



**Figure 30. Mécanisme du BER.**

Le mécanisme du BER permet la réparation des dommages touchant une seule base de l'ADN (Sancar et al., 2004).

## 1. Les voies de réparation « fidèles »

### A. BER

#### a. Le mécanisme du BER : réparation d'une base endommagée

Le mécanisme du BER intervient lorsqu'une seule base de l'ADN est endommagée par des agents alkylants ou oxydants. Le remplacement de la base se fait rapidement et fait intervenir cinq enzymes (Fig. 30) (Moustacchi, 2000) :

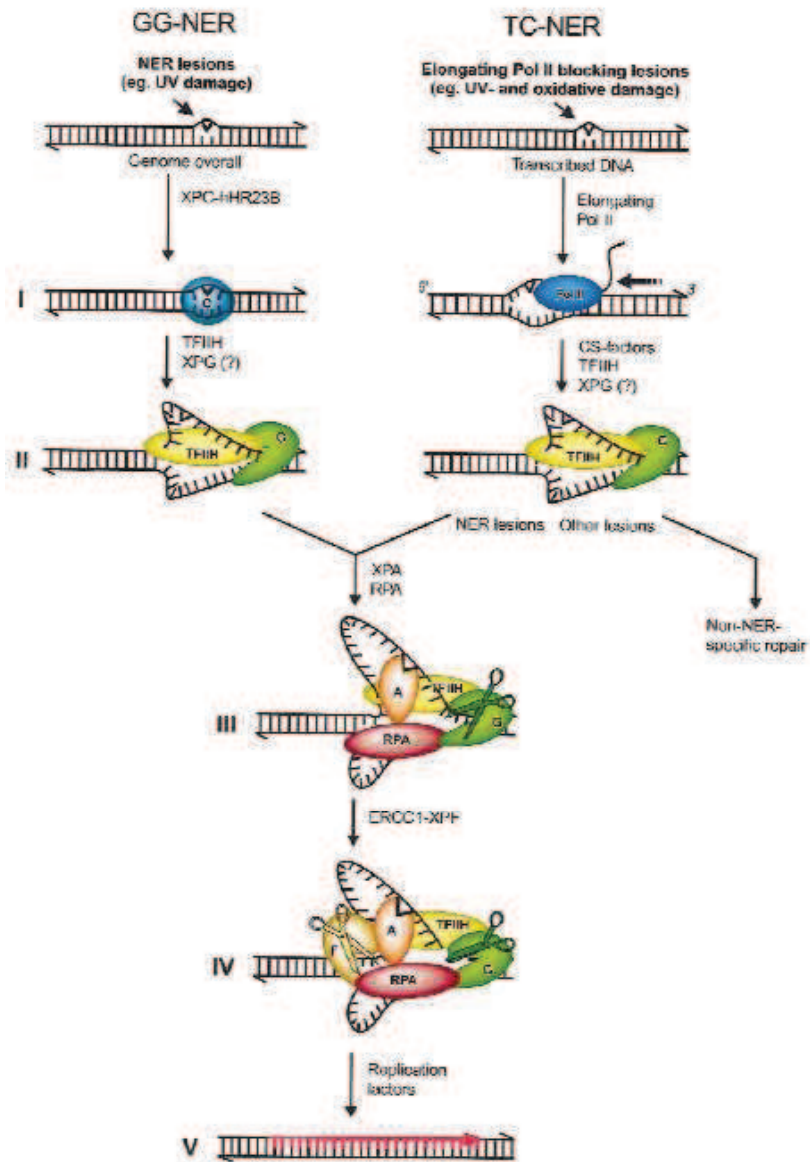
- Dans un premier temps, la base modifiée est repérée puis enlevée par une ADN glycosylase (spécifique du type de lésion) en coupant au niveau de la liaison N-glycosyle.
- Cette première étape engendre la formation d'un site abasique : apurinique/apyrimidique (site AP, absence d'un nucléotide) qui est pris alors en charge par une AP endonucléase. Cette enzyme coupe le désoxyribose.
- Une phosphodiesterase élimine ensuite le groupement sucre-phosphate. A ce stade, l'ADN possède donc un trou d'une base dans un brin.
- Ce trou est comblé par une ADN polymérase  $\beta$ , en prenant le brin complémentaire comme matrice.
- Enfin, une ADN ligase intervient pour relier la nouvelle base au brin d'ADN.

#### b. Les maladies associées au BER

Les défauts lors de la réparation de l'ADN par le mécanisme du BER peuvent engendrer des défauts d'ordre immunologique ou neurologique et aussi augmenter le risque de développer des cancers.

Par exemple, la mutation dans le gène *Mutyh*, qui code pour une ADN glycosylase impliquée dans le BER, entraîne un trouble appelé MAP (MYH-associated polyposis) dans lequel les patients développent de nombreux polypes au niveau du côlon. Ces polypes ont le potentiel de devenir





**Figure 31. Mécanisme de réparation NER.**

Mécanisme réparant les lésions de l'ADN causées par les UVs. Le GG-NER intervient sur l'ensemble du génome alors que le TC-NER sur les parties transcrites (de Laats et al., 1999).

cancéreux. D'autres mutations peuvent déclencher une ataxie, une atteinte du système nerveux qui se répercute sur les muscles conduisant à des troubles moteur. Enfin, au niveau immunologique, un défaut dans le BER peut entraîner le syndrome d'hyper-IgM de type V (HIGM5). Les patients présentent un fort taux d'IgM et un faible taux d'IgG et IgA, avec un risque d'infection élevé, ceci est dû à un défaut dans la commutation de classe lors de la génération des immunoglobulines (Wilson et al., 2011).

## B. NER

### a. Le mécanisme du NER : réparation des dommages induits par les UVs

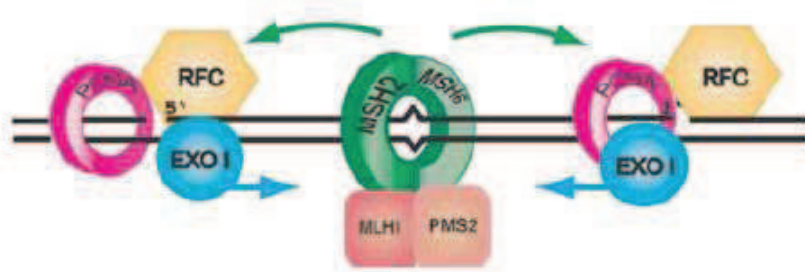
La réparation par excision de nucléotides intervient essentiellement dans les dommages de l'ADN causés par les rayons UV tels que les dimères cyclobutyliques de pyrimidines (CPDs) et les adduits pyrimidine (6-4) pyrimidone (6-4PPs). Ces lésions entraînent une modification de la structure de la double hélice d'ADN, bloquant sa réplication et sa transcription.

Il existe deux types de NER : le GG-NER (Global Genome-NER) qui répare les lésions sur l'ensemble du génome, en comparaison avec le TC-NER (Transcription-Coupled NER) qui n'intervient que sur les parties transcrites du génome (Fig. 31) (de Laat et al., 1999).

- **GG-NER** : la distorsion de l'ADN est reconnue par le complexe protéique XPC-hHR23B.
- **TC-NER** : la lésion de l'ADN est repérée au cours de la transcription de l'ADN par l'ARN polymérase II

Après reconnaissance des sites à réparer, le complexe protéique TFIIH est recruté. Il est composé de deux hélicases, XPB et XPD. Celles-ci ouvrent l'ADN sur 10 à 20 nucléotides de part et d'autre de la lésion.

La stabilisation de cette brèche dans l'ADN est réalisée par les protéines XPA et RPA. La coupure du brin d'ADN endommagé, en 3', est réalisée par RPA, et en 5' par ERCC1-XPF. Une fois le brin lésé enlevé, il est resynthétisé en prenant comme matrice le brin sain, via PCNA, RF-C et l'ADN polymérase ( $\delta$  ou  $\epsilon$ ). Enfin, ce brin néosynthétisé est relié à l'ADN en 5' par l'ADN hélicase I.



**Figure 32. Mécanisme du MMR.**

Le MMR intervient dans la réparation des mésappariements de l'ADN (Kunkel and Erie, 2005).

## b. Les maladies associées au NER

Une des premières maladies à avoir été associée à un dysfonctionnement dans le NER est le xeroderma pigmentosum. Ces patients présentent une incapacité à réparer les lésions causées par les UVs dus à des mutations dans le gène de *xpa* ou *xpc*. Par conséquent, une exposition au soleil est dangereuse pour les personnes affectées par cette maladie puisque les lésions de l'ADN générées par les UVs ne peuvent pas être réparées. Le risque de développer un cancer de la peau est très élevé chez ces patients. Les patients porteurs d'une mutation dans le gène *xpc* présente également un syndrome de neurodégénérescence.

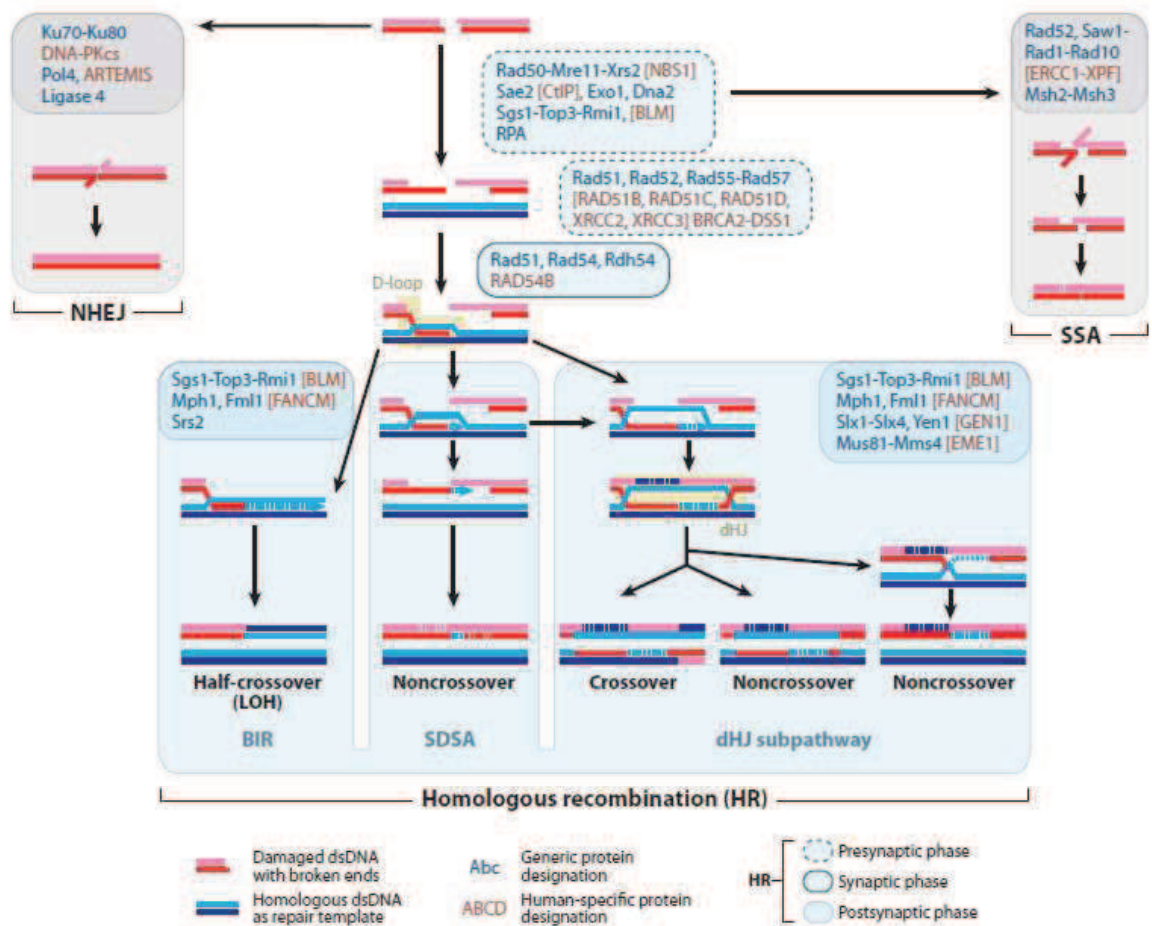
Une autre maladie reliée à un défaut dans le NER est le syndrome de Cockayne. Elle est causée par des mutations dans les gènes *csa* et *csb*. Ces patients présentent des retards de croissance et des problèmes neurologiques, notamment au niveau oculaire et auditif et une sensibilité aux UVs (Pascucci et al., 2011).

## C. MMR

### a. Le mécanisme du MMR : réparation des mésappariements et des délétions/insertions

Le MMR est la réparation des mésappariements et des insertions/délétions de bases survenant lors de la réplication de l'ADN et des événements de recombinaison.

Le mésappariement est reconnu par l'hétérodimère MutS $\alpha$  (interaction entre hMSH2 et hMSH6) ainsi que les insertions ou délétions de petites tailles. Les délétions/insertions de plus grande taille sont repérées par l'hétérodimère MutS $\beta$  (hMSH2 et hMSH3). L'échange de l'ADP en ATP, entraîne un changement de conformation du complexe qui forme alors une pince autour de l'ADN (Fig. 32). L'hétérodimère MutL (MLH1-PMS2) est ensuite recruté pour former un tétrahétérodimère avec MutS. Le complexe PCNA est, quant à lui, recruté au niveau de la coupure de l'ADN, présente sur le brin néosynthétisé, par la protéine RFC. MutL et MutS se déplacent le long de l'ADN jusqu'à PCNA-RFC. Ce dernier permet alors l'activation de la fonction endonucléasique de MutL et ainsi la coupure du brin d'ADN en 3' du mésappariement. L'exonucléase EXO1 intervient pour dégrader ce brin, laissant derrière elle un ADN simple brin qui est stabilisé par RPA. La synthèse



**Figure 33. Mécanismes de réparation des cassures de l'ADN.**

En bleu, la recombinaison homologue répare les cassures en utilisant une séquence homologue, par trois mécanismes : le BIR (Break-Induced Replication), le dHJ (double Holliday junction), le SDSA (Synthesis-Dependent Strand Annealing) (Heyer et al., 2010).

du nouveau brin d'ADN manquant est réalisée par l'ADN polymérase  $\delta$  et enfin le brin est reliqué au reste de l'ADN par l'ADN ligase I (Hsieh and Yamane, 2008; Kunkel and Erie, 2005).

### **b. Les maladies associées au MMR**

Les patients présentant un MMR non-fonctionnel, dû à des mutations essentiellement au niveau des gènes *mlh1* et *msh6*, développent des instabilités des microsatellites (répétitions d'une séquence de quelques nucléotides dans l'ADN). Ceci a pour conséquence l'émergence de certaines maladies tels les syndromes de Lynch (ou HNPCC pour Hereditary Non Polyposis Colon Cancer), de Muir-Torre et de Turcot. Ces patients sont prédisposés au développement de tumeurs notamment au niveau du côlon mais aussi au niveau des organes du tractus digestif ou de l'appareil urogénital. Dans le syndrome de Turcot, les patients présentent également des tumeurs au niveau du cerveau. (Felton et al., 2007; Peltomäki, 2001).

## **D. La recombinaison homologue**

### **a. Le mécanisme du HR : réparation des cassures double-brins d'ADN et des ponts inter-brins**

La recombinaison homologue (HR) est un mécanisme intervenant, tout d'abord, au cours de la méiose. En effet, juste avant la séparation des chromosomes, en première phase de méiose, la recombinaison permet l'échange d'allèles entre les différentes paires de chromosomes, assurant ainsi le brassage génétique intrachromosomique. La recombinaison est également un mécanisme de réparation de l'ADN. Etant donné qu'elle se base sur une séquence homologue, c'est-à-dire semblable, du génome, cette réparation est hautement fidèle, si tant est que la séquence servant de matrice n'ait pas subi de mutation. Ce mécanisme est utilisé dans la réparation des cassures double-brins et simple-brin de l'ADN et des ponts inter-brins.

La HR utilise, comme séquence homologue, préférentiellement celle se trouvant sur la chromatide sœur. Cela implique que l'ADN soit répliqué et présent à l'état  $2n$  chromosomes. La cellule doit donc être en phase S ou en début de G2 du cycle cellulaire (Heyer et al., 2010).

La HR se découpe en trois étapes (Fig. 33) :

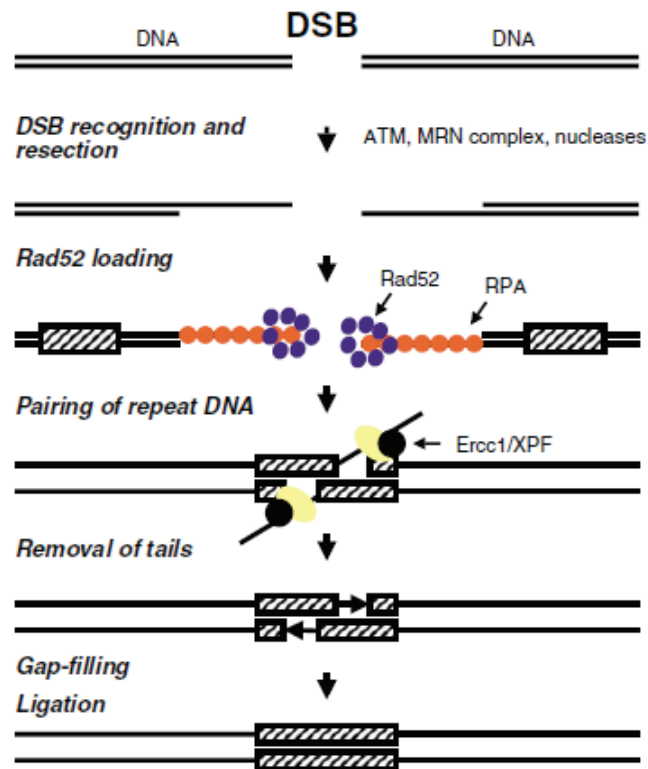
- **Présynapsis** : au niveau de la lésion, si besoin, le brin d'ADN est dégradé en 5' afin de générer un ADN simple-brin en 3'. La protéine RPA intervient alors pour enlever la structure secondaire du simple-brin. Ceci permet ainsi son recouvrement par la protéine Rad51, formant alors le filament présynaptique.
- **Synapsis** : durant cette phase la séquence homologue est recherchée à travers le génome. Une fois celle-ci trouvée, à l'aide de Rad54, se forme la D-loop (Displacement-Loop) ; le filament présynaptique s'insère entre les deux brins d'ADN de la séquence homologue.
- **Post-synaptique** : cette phase correspond à la synthèse du nouveau brin d'ADN, en prenant comme amorce la partie simple brin.

Trois mécanismes sont possibles :

- **Le BIR** (Break-induced Replication) : dans ce cas, l'élongation se fait à partir du fragment simple brin et se poursuit sur tout le long du chromosome, en l'absence du bout 5' de l'ADN lésé. Ce mécanisme a pour conséquence la perte d'hétérozygotie pour cet allèle puisque les deux allèles seront similaires sur chaque chromatide sœur.
- **Le SDSA** (Synthesis-Dependent Strand Annealing) : à l'inverse du premier schéma d'élongation, dans celui-ci, la deuxième extrémité de l'ADN est présente. Le brin néosynthétisé peut alors se religuer à cette extrémité.
- **Le dHJ** (Double Holliday Junction) : il s'agit du mécanisme employé lors de la méiose pour le brassage génétique. Dans ce cas-là, la synthèse des deux brins se fait en prenant comme brins matrices ceux du chromosome homologue. Selon la manière dont est résolue la jonction de Holliday, il peut y avoir en plus un échange d'ADN entre les deux chromatide sœur (crossing-over), augmentant ainsi le risque de réarrangement chromosomique.

### b. Les maladies associées au HR

Il y a essentiellement trois syndromes qui sont liés à des défauts dans la réparation par le mécanisme de la recombinaison homologue. Ils sont causés par des mutations au niveau des gènes de la famille des hélicases *RecQ* impliquées dans la HR : une mutation sur *Blm* induit le syndrome de Bloom, sur *Wrrn* le syndrome de Werner et sur *Recql4* le syndrome de Rothmund-Thomson. Ces patients présentent des instabilités génomiques, notamment des aberrations chromosomiques, une prédisposition au développement tumoral et un vieillissement prématuré. En plus, le syndrome de



**Figure 34. Mécanisme du SSA.**

Ce mécanisme intervient lorsque des séquences homologues sont présentes aux extrémités des cassures (Valerie and Povirk, 2003).



Bloom est caractérisé par des défauts de pigmentation de la peau et une sensibilité au soleil, un système immunitaire déficient, des troubles de la fertilité, le risque de développer un diabète de type II et un retard de croissance. Les patients atteints du syndrome de Werner présentent un vieillissement prématuré avec les pathologies associées (ostéoporose, cataracte, diabète...) et une taille plus petite. Le syndrome de Rothmund-Thomson est caractérisé par des anomalies du squelette et de la peau.

Une mutation dans le gène *Brca1* ou 2 conduit au développement de cancer au niveau du sein et ce de manière héréditaire (Ouyang et al., 2008).

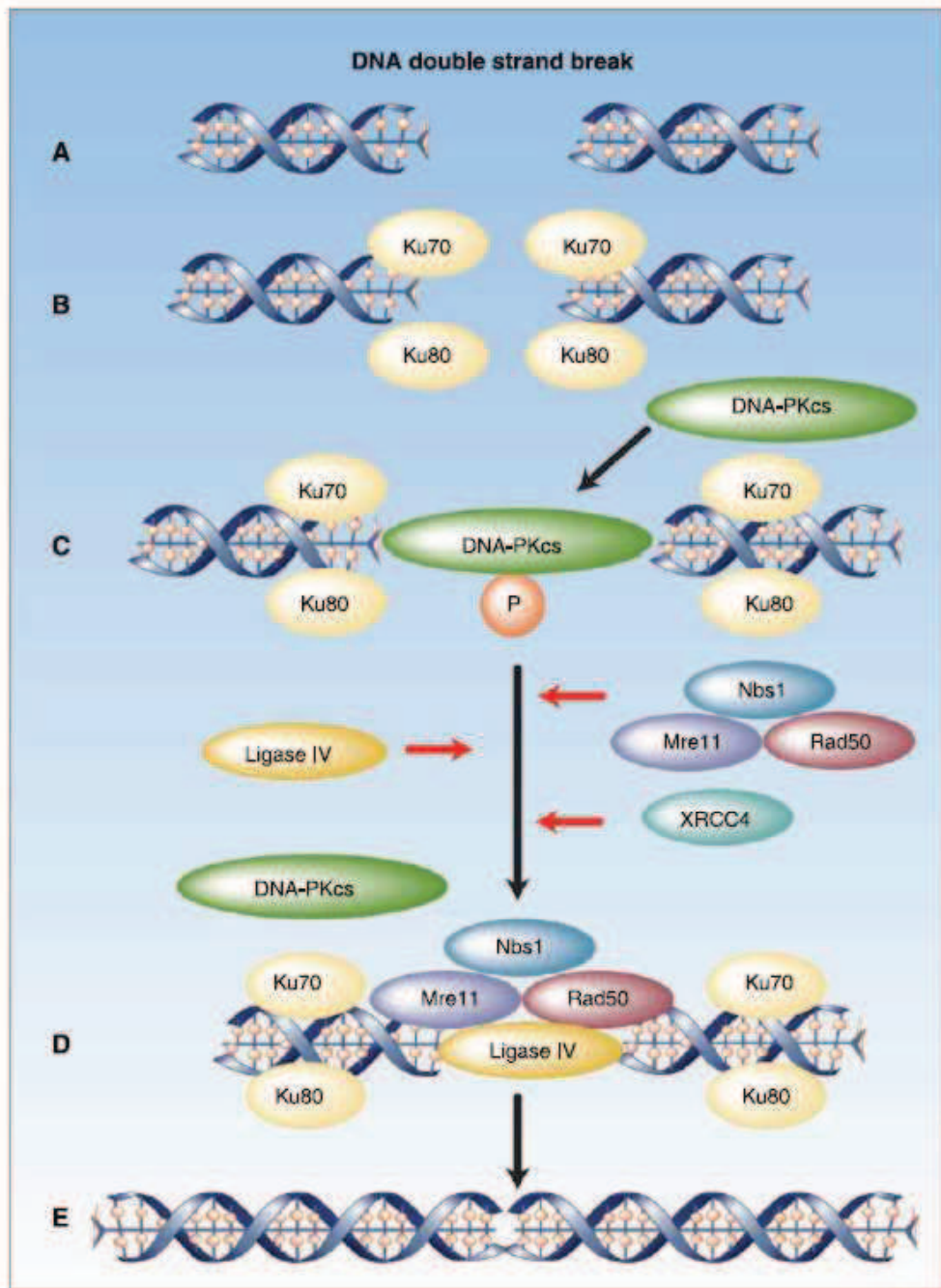
## 2. Les voies de réparation « infidèles »

### A. Le SSA : réparation des cassures de l'ADN

Le SSA (Single-Strand Annealing) est un type de réparation qui fait appel à la présence d'une séquence homologue présente à proximité de l'extrémité de l'ADN de part et d'autre de la cassure. L'extrémité 5' est réséquée par le complexe MRN afin de permettre l'alignement des séquences homologues du brin 3' sortant. La séquence en 3' non appariée est supprimée par l'action de nucléases, ERCC1/XPF, ce qui génère des délétions au niveau de l'ADN. La brèche est complétée par une ADN polymérase puis reliquée par une ligase (Fig. 34) (Valerie and Povirk, 2003).

### B. Le NHEJ

Contrairement à la recombinaison homologue, le mécanisme du NHEJ n'a pas besoin de séquence homologue pour réparer les cassures de l'ADN. Il peut donc intervenir à tout moment au cours du cycle cellulaire pour effectuer une réparation, il prédomine en G0/G1 et G2 (Natarajan and Palitti, 2008). Il existe deux types de NHEJ, la voie dite classique et la voie dite alternative qui n'est active que dans certaines conditions. Ces deux types de NHEJ ne font pas intervenir les mêmes protéines.



**Figure 35. Mécanisme du NHEJ classique.**

Mécanisme de réparation des cassures double-brins de l'ADN faisant appel aux protéines KU70/80 et la DNA-PKcs (Chen and Nirodi, 2007).

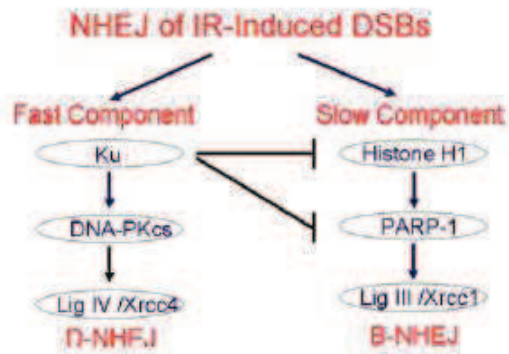
## a. Le mécanisme du NHEJ : réparation des cassures double-brins de l'ADN

### i. Le NHEJ classique (C-NHEJ)

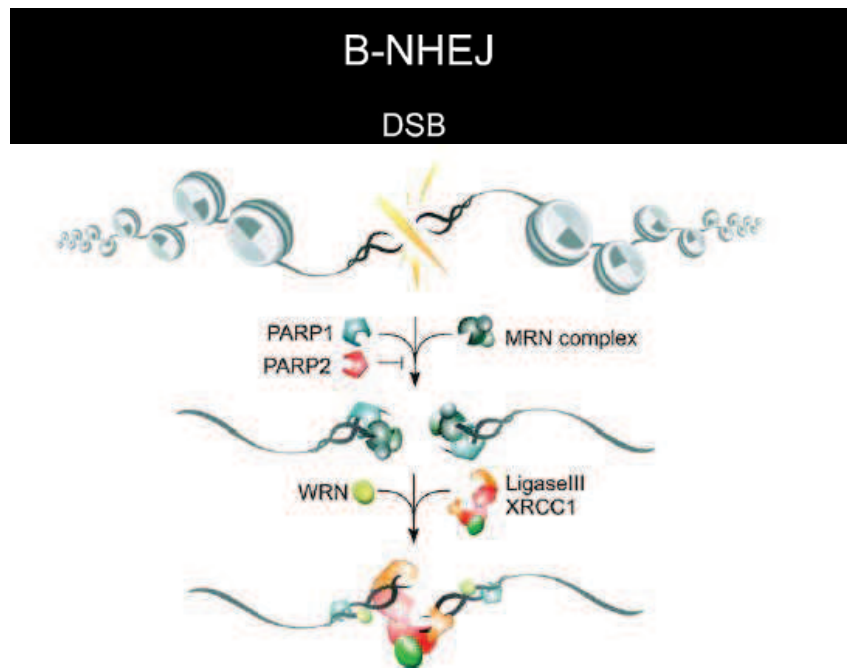
Le C-NHEJ est le **mécanisme principal** par lequel une cellule répare ses cassures double-brins de l'ADN.

Les premières molécules à intervenir sont les protéines KU70 et KU80 (Fig. 35). Ces protéines s'assemblent en un hétérodimère caractéristique par sa structure tridimensionnelle. En effet, elle forme un anneau à l'intérieur duquel peut passer l'hélice d'ADN, tel un fil dans le chas d'une aiguille à coudre. Ce complexe s'enfile autour de l'ADN à une de ces extrémités et peut librement circuler le long de l'hélice, de manière ATP-dépendante, sans spécificité de séquence nucléotidique. Une fois localisé au niveau d'une cassure de l'ADN, le complexe Ku recrute la sous-unité catalytique de la sérine/thréonine kinase ADN-dépendante, DNA-PKcs ; l'ensemble forme le complexe DNA-PK. L'étape suivante est l'autophosphorylation de ce complexe. Cette phase est nécessaire pour la réparation de la cassure et est dépendante de la présence de l'ADN. Elle permet également le recrutement des autres facteurs nécessaires à la réparation. Notamment le complexe MRN, composé des trois protéines MRE11, RAD50 et NBS1. Une protéine RAD50 peut en présence de zinc, créer un pont avec une autre protéine RAD50. Sachant qu'il y a un complexe MRN sur chaque extrémité d'une cassure, il est émis l'hypothèse que ce complexe, et notamment par les ponts réalisés entre les protéines RAD50, permet de maintenir à proximité deux extrémités devant être reliées. Si les deux extrémités de l'ADN sont compatibles, alors XRCC4 et la ligase IV interviennent pour religuer l'ADN. Cette situation n'est pas celle de la majorité des cassures. Bien au contraire, les extrémités de la cassure peuvent ne pas être cohésives. Dans ce cas-là, les extrémités sont traitées avant d'être reliées. Pour cela, la DNA-PK recrute la protéine Artémis. Il s'agit d'une enzyme à activité exonucléasique en 5'. Lorsqu'elle est recrutée par la DNA-PK, cette dernière la phosphoryle et l'active. Elle peut alors supprimer des nucléotides jusqu'à obtenir des extrémités religables ; c'est notamment cette étape qui est responsable de l'intégration d'erreurs dans la séquence d'ADN (van Gent and van der Burg, 2007).

Le mécanisme du C-NHEJ est également utilisé pour réparer des cassures de l'ADN dites physiologiques lors de la recombinaison V(D)J. Cette recombinaison a lieu dans les cellules immunitaire, les lymphocytes pre-B et pre-T. C'est par ce processus que l'organisme génère une diversité d'immunoglobulines en recombinant aléatoirement des fragments d'ADN V (variété), D (diversité) et J (jonction). Pour cela, la cellule clive l'ADN au niveau de ces fragments via les protéines



**Figure 36. Régulation des deux mécanismes du NHEJ.**  
Le NHEJ classique (D-NHEJ) régule négativement la voie alternative (B-NHEJ) (Iliakis, 2009).



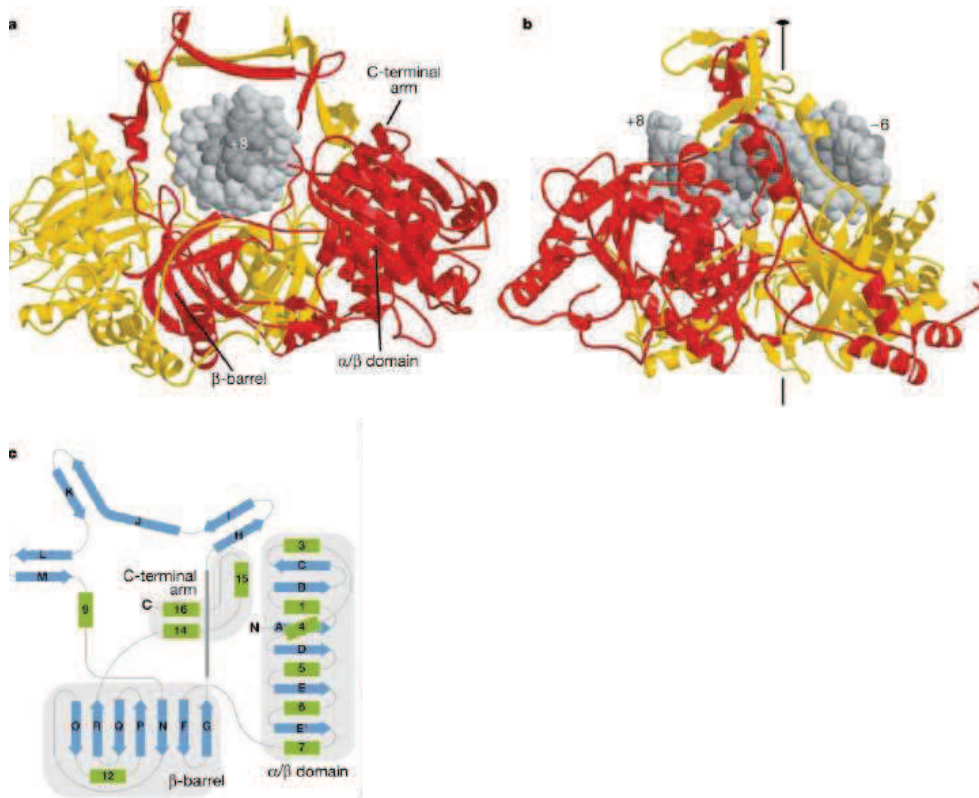
**Figure 37. Mécanisme de réparation du NHEJ alternatif.**  
Mécanisme de réparation des cassures double-brins faisant appel aux protéines PARP et ligase III, en l'absence des protéines du NHEJ classique KU, DNA-PKcs ou Ligase IV (Mladenov and Iliakis, 2011).

RAG1 et RAG2, entraînant ainsi la survenue de ces cassures physiologiques. Une fois leur génération, elles sont prises en charge par le mécanisme du NHEJ pour relier les fragments d'ADN et créer les différentes séquences d'immunoglobuline. C'est pourquoi les déficiences dans la réparation NHEJ engendrent non seulement une sensibilité au développement tumoral, du fait de l'incapacité à réparer les cassures de l'ADN, mais également une immunodéficiência, causée par l'impossibilité de réaliser la recombinaison V(D)J (Lieber et al., 2004).

## ii. Le Backup-NHEJ (B-NHEJ) ou NHEJ alternatif (A-NHEJ)

Il a été observé que lorsqu'un des acteurs clés du C-NHEJ est manquant, tel que KU (Wang et al., 2001b; Wang et al., 2006), la DNA ligase IV (Wang et al., 2001a) ou la DNA-PK (Terzoudi et al., 2008), les cassures double-brins sont tout de même réparées mais de manière beaucoup moins rapide (Fig. 36). En effet dans ce cas de figure, un autre mécanisme de réparation intervient, il s'agit du NHEJ alternatif (A-NHEJ ou B-NHEJ pour Backup-NHEJ). La poly(ADP-ribose) polymérase 1 (PARP1) se fixe, en compétition avec Ku, mais avec une affinité plus faible, sur les extrémités de l'ADN au niveau des cassures. C'est pourquoi en l'absence de KU, notamment, le B-NHEJ peut entrer en jeu puisque les extrémités des cassures sont libres pour la fixation de PARP1, stimulée par l'histone H1. (Iliakis, 2009)

Dans ce type de réparation, la machinerie cellulaire a besoin d'une séquence de microhomologie pour relier deux extrémités. L'histone H1 permet de maintenir les deux extrémités à relier, à proximité, tandis que MRE11 effectue leurs maturations afin de permettre leur alignement au niveau de la séquence de microhomologie. Ceci a pour conséquence d'entraîner des délétions au niveau d'une séquence d'ADN, puisque la séquence se situant entre la cassure et la microhomologie est perdue lors de la religation. Le trou au niveau de l'ADN est comblé par une polymérase infidèle telle que la pol $\eta$  et la pol $\zeta$ . La religation fait appel à l'intervention de la ligase III en association avec XRCC1 et WRN (Fig. 37). Ce mécanisme engendre des délétions/insertions de l'ADN mais est aussi responsable de réarrangements chromosomiques ; il peut ainsi favoriser le développement de tumeurs (McVey and Lee, 2008; Mladenov and Iliakis, 2011).



**Figure 38. Structure du complexe KU-ADN.**

Structure tridimensionnelle du complexe KU entourant l'ADN (a, b). Schéma de la protéine KU, en vert les hélices  $\alpha$ , en bleu les feuillet  $\beta$  (c) (Walker et al., 2001).

## b. Les grands acteurs et leurs fonctions

### i. KU70/80

Le complexe KU70-KU80 a été identifié, pour la première fois, comme étant un auto-antigène chez un patient atteint d'une myosite de chevauchement, maladie auto-immune. Les auto-anticorps dirigés contre le complexe KU sont retrouvés dans plusieurs autres maladies auto-immunes telles que le lupus ou la sclérodermie (Mimori et al., 1981).

Le complexe KU est un hétérodimère formé par les protéines KU70 et KU80 ayant une taille respectivement d'environ 70KDa et 80KDa (69KDa et 83KDa). KU70 possède seulement 14% d'homologie de séquence avec KU80, cependant leurs structures tridimensionnelles sont semblables et symétriques. Les protéines KU sont composées d'un domaine central en tonneau qui peut interagir avec les groupements phosphate-sucre de l'ADN. Elles possèdent également un domaine en hélice au niveau du bras C-terminal, participant à l'interaction avec d'autres protéines, comme la DNA-PKcs, et la formation de l'hétérodimère en interagissant avec le domaine en tonneau de son partenaire. Quant à la partie N-terminale, composée de domaines  $\alpha/\beta$ , elle intervient dans la formation du complexe de réparation de l'ADN (Gullo et al., 2006; Rathaus et al., 2009). L'hétérodimère fixé sur l'ADN, recouvre deux tours d'hélice, l'anneau qui encercle l'ADN, quant à lui, n'englobe que trois à quatre paires de bases (Fig. 38).

Ces protéines de liaison à l'ADN sont présentes en abondance au sein des cellules et y ont un rôle important dans l'homéostasie et la survie de la cellule. En effet, ces protéines interviennent dans différents processus cellulaires importants pour le bon fonctionnement de la cellule, tels que la réparation des cassures de l'ADN, l'apoptose et le maintien des télomères. Les protéines KU ont également une activité sur la transcription de certains gènes (Wu and Lieber, 1996).

Les souris invalidées pour *Ku70* ou *Ku80* présentent un déficit en lymphocytes T et B du à une incapacité à effectuer la recombinaison V(D)J. Les souris sont également de plus petite taille. De plus, les souris déficientes en *Ku70*, développent fréquemment des lymphomes au niveau du thymus (Li et al., 1998).

La culture de fibroblastes déficients pour les protéines KU présente un faible pouvoir prolifératif et une senescence précoce dus au rôle de KU dans le maintien des télomères. Ces cellules sont également radiosensibles et montrent une faible capacité à survivre après une exposition à des radiations liées à la fonction indispensable de KU dans le C-NHEJ (Featherstone and Jackson, 1999).

Les protéines KU interviennent dans plusieurs mécanismes :

- La réparation des cassures par le mécanisme du NHEJ.
- La génération des immunoglobulines et les récepteurs des cellules T du système immunitaire par le mécanisme de recombinaison V(D)J.
- L'apoptose médiée par BAX.
- Le maintien des télomères.

### ➤ **NHEJ**

Les protéines KU sont des acteurs indispensables de la réparation des cassures de l'ADN par le mécanisme du NHEJ dit classique.

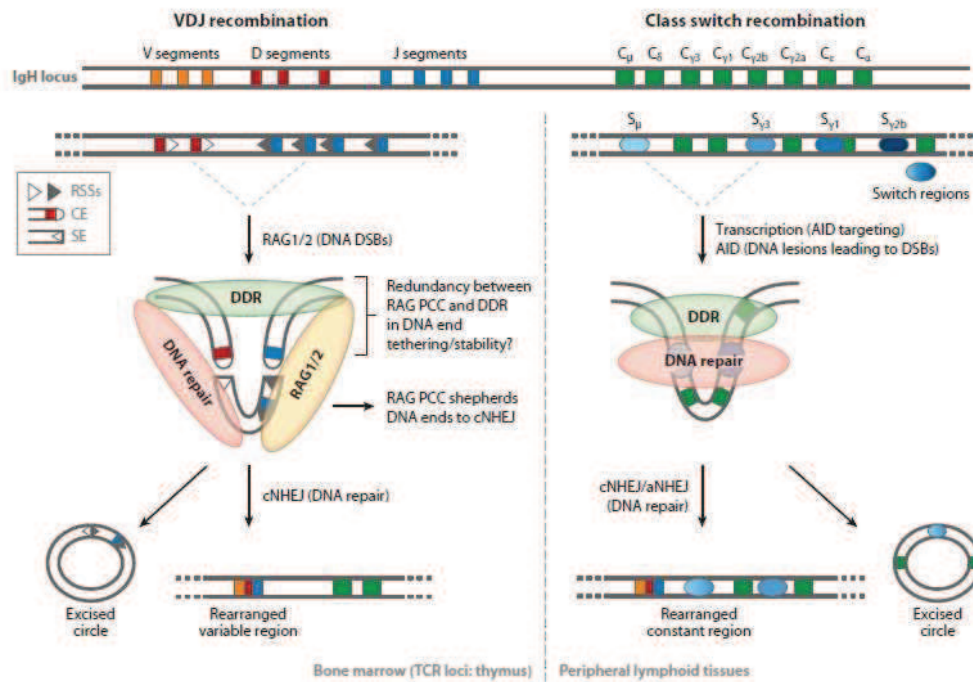
Elles reconnaissent les extrémités libres de l'ADN présentes au niveau de cassures et s'y fixent de manière séquence et structure-indépendantes. Cette interaction avec l'ADN requiert la région C-terminale de 40KDa de KU70 et celle de 45KDa de KU80 (Dyran and Yoo, 1998).

Lors de la réparation d'une cassure de l'ADN, les protéines KU se fixent sur chaque extrémité de l'ADN et recrutent d'autres acteurs nécessaires à la réparation. Les deux hétérodimères, sur chaque extrémité, peuvent alors former un tétramère qui stabilise les extrémités et les maintient à proximité l'une de l'autre pour, si elles sont compatibles, permettre la religation de l'ADN. Si elles ne sont pas directement religables, les protéines KU peuvent alors glisser le long de l'ADN avec une périodicité de 25 paires de bases et laisser ainsi la place aux autres protéines qui vont traiter les extrémités afin de les rendre compatibles (Tuteja et al., 1994).

En plus de sa capacité à se lier à l'ADN, les protéines KU possèdent également une activité hélicase-dépendante de l'ATP, et pour ce, possèdent un site de liaison à l'ATP (Tuteja et al., 1994).

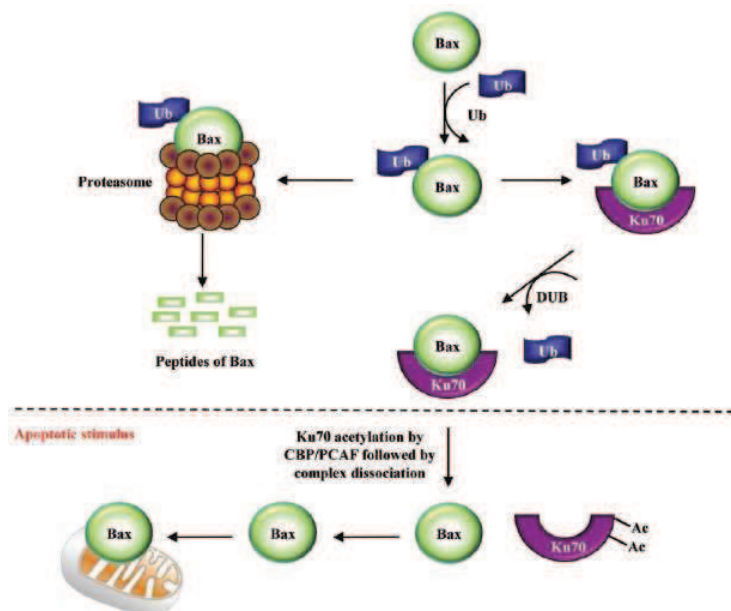
Les protéines KU peuvent interagir avec d'autres protéines. Par exemple, la protéine intervenant dans la formation des corps de Cajal, la Coilin, interagit avec KU70 et KU80. Il en résulte alors une nouvelle fonction pour cette protéine, celle d'inhibiteur de la réparation NHEJ (Velma et al., 2010).





**Figure 39. Mécanisme de génération des immunoglobuline.**

Les immunoglobulines sont générées par les mécanismes de la recombinaison V(D)J et de commutation de classe, faisant appel au système de réparation NHEJ classique (Deriano and Roth, 2013).



**Figure 40. Régulation de l'apoptose par KU70.**

KU70 régule l'apoptose en déubiquitinant la protéine BAX et en le séquestrant dans le cytoplasme (Rathaus et al., 2009).

➤ **VDJ**

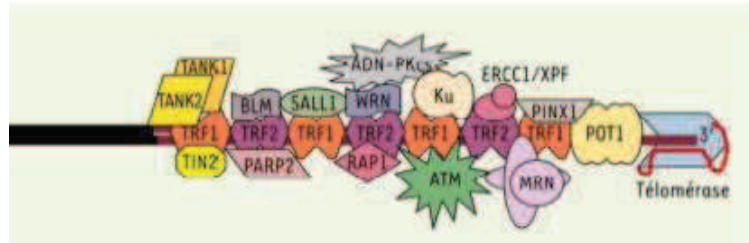
Les protéines KU interviennent également dans la recombinaison V(D)J. Ce processus permet la génération de la diversité des immunoglobulines et des récepteurs des cellules T du système immunitaire. Ceci se fait par le biais d'une recombinaison de différentes séquences codant pour la partie Variable (V), de Diversité (D) et de Jonction (J) (Fig. 39). Pour cela, la cellule induit volontairement des cassures de l'ADN au niveau de ces séquences qui pourront ensuite être réparées par le mécanisme du NHEJ dans lequel KU70 et KU80 interviennent (Rathaus et al., 2009; Tuteja et al., 1994).

➤ **Apoptose**

KU70 possède également une fonction hors du noyau. En effet, au niveau du cytoplasme, KU70 peut interagir avec la protéine BAX. BAX est une protéine pro-apoptotique, qui lorsque la cellule reçoit un signal de mort, migre à la mitochondrie. BAX forme alors un oligomère au niveau de la membrane de la mitochondrie et la rend perméable. Ceci permet le relargage du Cytochrome C de la membrane mitochondriale, qui, à son tour déclenche la cascade d'activation de la voie apoptotique caspase-dépendante conduisant la cellule vers la mort.

KU70, en interagissant avec BAX, la séquestre au niveau du cytoplasme, empêchant ainsi l'amorçage de l'apoptose par le Cytochrome C. KU70 exerce ainsi une fonction anti-apoptotique. Lors d'un signal d'apoptose, KU70 est acétylée par des acétyltransférases (telle que CBP) et libère ainsi BAX. De plus, KU70, par son activité de déubiquitination, supprime l'ubiquitine présente sur BAX, empêchant ainsi sa dégradation par le protéasome (Fig. 40). KU70 exerce, en même temps qu'une fonction anti-apoptotique, une action pro-apoptotique. Par ces deux rôles, KU70 semble donc maintenir un bon équilibre entre une activation trop importante ou trop faible de l'apoptose via BAX (Rathaus et al., 2009).

Par ailleurs, KU régule négativement l'expression du gène *Apaf1* qui code pour une protéine nécessaire à la formation de l'apoptosome, juste après la survenue de lésions dans l'ADN. Ceci laisse du temps à la cellule pour tenter de réparer ces lésions. Si les lésions sont trop importantes ou irréparables, alors les protéines KU quittent le promoteur d'*Apaf1*, permettant son expression et en conséquence, l'apoptose de la cellule (De Zio et al., 2010).



**Figure 41. Schéma d'un télomère.**

Le télomère est recouvert d'un certain nombre de protéines afin d'assurer sa protection, dont les protéines KU et DNA-PKcs du NHEJ (Rathaus et al., 2009).

### ➤ **Télomère**

Les télomères sont des répétitions de séquences d'ADN non codantes (TTAGGG) présentes à la fin des chromosomes. Ils sont également formés d'un brin sortant en 3' riche en G, qui peut se replier et interagir avec la séquence télomérique. Ceci forme une boucle appelée T-loop. Les télomères possèdent deux rôles importants. Le premier est de permettre à la polymérase de répliquer le génome jusqu'au bout sans perte d'information. Le second est de protéger ses extrémités d'ADN contre la machinerie de réparation de l'ADN qui pourrait les considérer comme des cassures. Les télomères empêchent ainsi la fusion des chromosomes. Pour cela, un complexe protéique recouvre ces séquences, composé de la protéine Sheltering, TRF (Telomeric Repeat binding Factor) et des protéines impliquées dans la réparation de l'ADN. Leur synthèse est assurée par une transcriptase inverse, la télomérase, une ribonucléoprotéine (Rathaus et al., 2009). Le complexe KU intervient également dans le maintien des télomères (Fig. 41). Il interagit avec la sous-unité protéique de la télomérase, hTERT (human Telomerase Reverse Transcriptase) pour réguler son activité et faciliter son recrutement au niveau des télomères (Chai et al., 2002) mais également avec la protéine TRF1 (Hsu et al., 2000). Ici, à l'inverse de son activité dans le NHEJ, KU participe à la prévention de la fusion des chromosomes et de la perte importante de séquences télomériques.

### ii. DNA-PKcs

La sous-unité catalytique de la DNA-PK (DNA-PKcs) fait partie de la famille des phosphatidylinositol-3-OH kinase (PI(3)K). Elle est exprimée de manière constitutive et en abondance chez les mammifères. En présence de cassures double-brins de l'ADN, elle peut s'associer au dimère formé par les protéines KU70 et KU80 et acquiert ainsi sa fonction de serine/thréonine kinase.

La DNA-PK permet d'une part le maintien à proximité des deux fragments d'ADN et d'autre part le recrutement des facteurs nécessaires à la réparation. Elle exerce également une fonction protectrice sur les extrémités des cassures contre les dégradations exonucléasiques (Kong et al., 2011b). La DNA-PKcs, tout comme KU, intervient dans la protection des télomères (Hill and Lee, 2010).

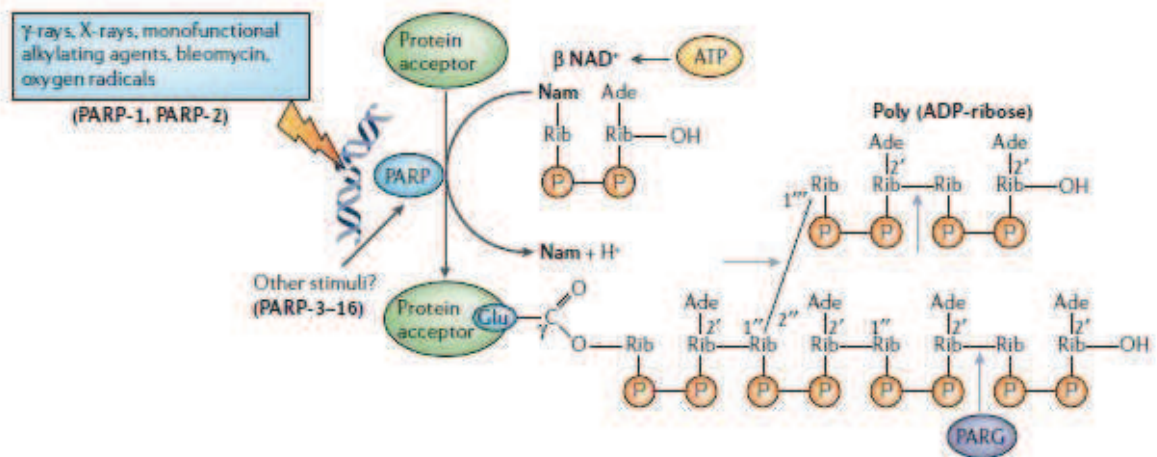
Une des premières fonctions de la DNA-PK est son autophosphorylation. Deux zones principales sont concernées par cette autophosphorylation. La première se situe de l'acide aminé 2023 à 2056 dans le domaine appelé ABCDE ; la deuxième, de l'acide aminé 2609 à 2647 au niveau

du domaine PQR. La phosphorylation de ces domaines entraîne des changements de conformation de la DNA-PK lui permettant d'acquies ses fonctions dans la réparation C-NHEJ ou lors de la recombinaison V(D)J. L'autophosphorylation du domaine ABCDE permet d'aligner les deux brins d'ADN à relier et de les rendre accessibles aux protéines de réparation alors que celle dans le domaine PQR permet de contrôler le processing des extrémités de l'ADN à relier, et ainsi la perte d'un trop grand nombre de nucléotides, ce qui serait délétère pour l'intégrité du génome (Cui et al., 2005; Meek et al., 2008).

Un troisième site d'autophosphorylation, sur la thréonine 3950, a été mis en évidence. Cette autophosphorylation intervient dans la régulation de l'activité kinase de la DNA-PK (Douglas et al., 2007).

Activée par autophosphorylation, la DNA-PK phosphoryle également d'autres protéines telles que XRCC4, Artémis, Oct-1 ou p53 (sur les sérines 15, 37 et 46). Cette dernière, lorsqu'elle est phosphorylée par DNA-PK, entraîne une cascade de réponses conduisant à l'apoptose. La DNA-PK intervient également dans l'apoptose médiée par BAX en phosphorylant KU70 (sérines 6 et 51). KU70 phosphorylée ne peut plus interagir avec BAX, permettant alors la translocation de BAX vers la mitochondrie et ainsi le relargage du Cytochrome C (Hill and Lee, 2010). Lors de l'apoptose, la DNA-PK est clivée par des protéases, notamment la Caspase 3, afin de prévenir son activation par la fragmentation de l'ADN. La sur-activation de la DNA-PK entraînerait une utilisation accrue de l'ATP de la cellule par cette dernière dans le processus de phosphorylation ; la déplétion en ATP est délétère pour la cellule en la conduisant vers la nécrose (Smith and Jackson, 1999).

Etant données les fonctions importantes de la DNA-PK dans la réparation de l'ADN et la survie cellulaire, et par conséquent sur le développement tumoral, les chercheurs se sont naturellement penchés sur la génération d'inhibiteurs de la DNA-PK, à des visées thérapeutiques mais également pour être utilisés en laboratoire afin de mieux comprendre le fonctionnement de cette protéine. Ainsi plusieurs inhibiteurs ont vu le jour. Les deux inhibiteurs les plus utilisés en recherche sont la wortmannin (métabolite issu du champignon) et le LY294002. De manière générale, ce sont des inhibiteurs de protéine PI3-kinase (Izzard et al., 1999).



**Figure 42. PARP et poly(ADP-ribose).**

La PARP utilise le NAD<sup>+</sup> de la cellule pour catalyser la synthèse d'ADP-ribose sur une protéine cible (Schreiber et al., 2006).

### iii. PARP1 et ADP-ribosylation

#### ➤ *Fonctions de PARP1 et de l'ADP-ribosylation*

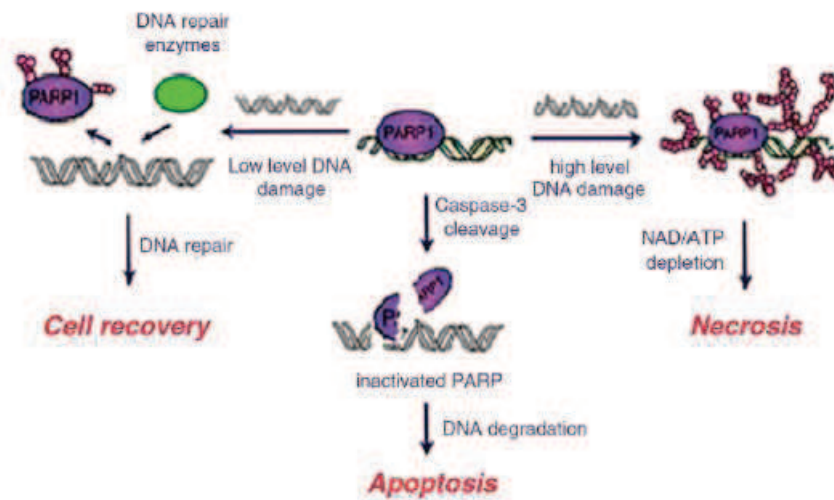
La poly(ADP-ribose) polymérase 1 (PARP1) est une protéine de 116kDa. Elle contient un domaine de liaison (trois doigts de zinc) à l'ADN dans sa partie N-terminale. La partie centrale est la zone qui peut être ADP-ribosylée, et comprend aussi un domaine riche en leucine, permettant l'homo- ou hétérodimérisation. Enfin la partie C-terminale est la région catalytique de la protéine permettant la synthèse du polymère d'ADP-ribose (Luo and Kraus, 2012).

PARP1 est une polymérase qui utilise le  $\text{NAD}^+$  (Nicotinamide Adénine Dinucléotide) de la cellule pour catalyser l'addition d'un monomère ou d'un polymère d'ADP-ribose (PAR) sur le groupement carboxyle d'un acide aminé (acide glutamique, acide aspartique ou lysine) d'une protéine cible ou sur elle-même (Fig. 42). Cette ADP-ribosylation est une modification post-traductionnelle des protéines qui peut modifier leurs activités. Ce groupement peut être supprimé par l'intermédiaire d'une PARG (poly(ADP-ribosyl) glycohydrolase).

Lorsqu'une protéine est modifiée par ADP-ribosylation, il en résulte une modification de de son activité par encombrement stérique et/ou par modification de la charge de la protéine (Krishnakumar and Kraus, 2010). Elle peut alors interagir avec de nouvelles protéines, via le PAR, contenant des motifs de liaison au PAR (PBM, PAR-Binding Motif ; PBZF, PAR-Binding Zinc Finger ; macrodomaine). L'ADP-ribosylation peut aussi moduler l'interaction entre des protéines ou avec l'ADN, leur dégradation et peut également engendrer une relocalisation de la protéine ADP-ribosylée (Pleschke et al., 2000).

PARP, via l'ADP-ribosylation a un impact sur différents processus cellulaires : la survie et la mort cellulaire, la régulation transcriptionnelle, le maintien des télomères, la formation du fuseau mitotique, le trafic intracellulaire et le métabolisme énergétique (Schreiber et al., 2006).

PARP1 intervient dans la régulation de la transcription des gènes en jouant sur plusieurs aspects. Elle peut agir sur la condensation de la chromatine en ADP-ribosylant les histones, contrôlant ainsi l'accessibilité des gènes à la machinerie transcriptionnelle et donc leur expression. Cette régulation est modulable en fonction des stimuli reçus par la cellule et permet donc la bonne expression des gènes nécessaire à un moment donné. Elle peut également agir comme un co-répresseur ou co-activateur de la transcription en facilitant l'échange des répresseurs pour des activateurs au niveau du promoteur. Elle peut également activer l'expression d'un gène en se fixant



**Figure 43. Le niveau de dommage dans l'ADN influence le devenir de la cellule.**

Pour des niveaux faibles de lésions, l'activation de PARP1 conduit à la réparation de l'ADN. A un niveau élevé, la suractivation de PARP1 entraîne la déplétion en  $\text{NAD}^+$  de la cellule conduisant à la nécrose. Des niveaux modérés inactive PARP1 conduisant à l'apoptose (Sodhi et al., 2010).



sur des séquences spécifiques de l'ADN. Enfin, PARP1 joue un rôle sur l'expression des gènes au niveau de la régulation par les insulateurs, qui préviennent l'activation du promoteur par les séquences activatrices (Kraus, 2008).

PARP1 sert de protéine senseur du stress cellulaire. Suivant le niveau de stress subi par la cellule, PARP1 va aiguiller la cellule vers une voie plutôt qu'une autre. A un niveau de stress faible, elle induit les processus d'inflammation. A un niveau moyen, elle va favoriser la réparation des cassures de l'ADN et donc la survie cellulaire. Si le stress est trop important, elle va alors diriger la cellule vers la sénescence ou la mort cellulaire (Luo and Kraus, 2012).

PARP1 intervient dans la réparation des cassures de l'ADN. Lors d'une cassure, PARP1 la détecte et devient hautement active. Elle catalyse alors la transformation du  $\text{NAD}^+$  en ADP-ribose qu'elle fixe sur elle-même ou sur des protéines cibles. Le polymère d'ADP-ribose étant chargé négativement, des forces électrostatiques s'exercent entre les protéines modifiées (notamment les histones) et l'ADN. Ceci conduit alors à des modifications de l'environnement de la cassure et la rend accessible aux protéines nécessaires à la réparation telles que les topoisomérases, hélicases (Sodhi et al., 2010). PARP1 est un élément clé de la réparation BER mais elle intervient également dans la réparation des cassures double-brins pour le HR et NHEJ en interagissant avec des effecteurs de ces voies de réparation (ATM, DNA-PKcs, KU80, MRE11 et NBS1) (De Vos et al., 2012). PARP1, cependant, possède un rôle plus important dans le B-NHEJ où elle y est un acteur indispensable à ce mécanisme de réparation.

Dans la situation où PARP1 engendre la mort cellulaire en induisant le processus apoptotique via la génération de PAR, elle stabilise p53 et permet aussi le relargage du facteur d'induction de l'apoptose AIF par la mitochondrie. Une fois le processus initié, des caspases interviennent pour cliver PARP1 et ainsi éviter la déplétion en  $\text{NAD}^+$  de la cellule (précurseur de l'ATP), ce qui aurait pour conséquence d'entraîner une crise énergétique conduisant à la nécrose de la cellule (Fig. 43) (Sodhi et al., 2010). Une sur-activation de PARP1 peut donc entraîner la nécrose de la cellule ainsi qu'une réponse inflammatoire par la déplétion en  $\text{NAD}^+$  de la cellule. De ce fait, elle est impliquée dans différentes pathologies telles que l'infarctus du myocarde, l'AVC (Accident Vasculaire Cérébral), les maladies neurodégénératives ou bien encore dans l'allergie (Tentori et al., 2002).

### ➤ *Inhibiteurs de PARP et cancer*

Etant donné, d'une part la surexpression de PARP1 dans certains cancers, et d'autre part, son implication dans la réparation de l'ADN et dans la mort cellulaire, il était intéressant de s'attacher à l'étude d'inhibiteur de PARP et leur impact dans le développement et le traitement tumoral.

Les inhibiteurs de PARP sont des molécules analogues au  $\text{NAD}^+$  qui peut alors se fixer au niveau du site catalytique de l'enzyme et ainsi empêcher la formation d'ADP-ribose. Ceci a pour conséquence de bloquer, d'une part, la libération de la cassure d'ADN par PARP1 et d'autre part, le recrutement et l'activation des autres protéines nécessaires à la réparation de la cassure. L'accumulation de brèches dans l'ADN conduit donc la cellule vers la mort. De plus, PARP1 étant inhibée, cette accumulation n'entraîne pas sa sur-activation et donc l'utilisation du  $\text{NAD}^+$  de la cellule, favorisant ainsi la mort par apoptose et non pas par nécrose (Kummar et al., 2012).

Les inhibiteurs de PARP ont l'intérêt d'être utilisés en complément d'une chimiothérapie pour les tumeurs dans lesquelles les cellules sont déficientes pour une des voies de réparation de l'ADN (par exemple les cancers du sein ou de l'ovaire possédant une mutation dans le gène BRCA1/2, impliqué dans le BER). En effet, l'agent cytotoxique ou les radiations ionisantes induisent des modifications de l'ADN. Les cellules de la tumeur étant déficientes en BER ou bien en HR, les cassures dans l'ADN s'accumulent et conduisent la cellule vers l'apoptose. L'inhibition de PARP1 prévient ainsi la nécrose et l'inflammation (Peralta-Leal et al., 2009). Les inhibiteurs de PARP1 sont pour le moment en phase d'essai clinique mais pourraient bien être utilisés en combinaison avec une thérapie cytotoxique ou par rayons ionisants ou même en monothérapie dans plusieurs types de tumeurs solides. Notamment dans le cancer du côlon, des premières études montrent que l'utilisation de l'inhibiteur ABT-888 en combinaison avec une chimiothérapie telle que l'irinotecan ou oxaliplatine, rend les cellules plus sensibles au traitement (Davidson et al., 2013).

### **c. Les maladies associées au NHEJ**

Les translocations chromosomiques sont responsables de 20% des cancers (Bunting and Nussenzweig, 2013). Des études semblent mettre en évidence une implication des mécanismes du NHEJ dans ces anomalies chromosomiques. En effet, aussi bien le C-NHEJ que le A-NHEJ, sont des mécanismes de réparation dits infidèles pouvant très bien joindre deux fragments de chromosomes différents lors de réparations de cassures de l'ADN touchant par exemple deux chromosomes. Les translocations qui en résultent peuvent alors favoriser le développement tumoral.

Par exemple, le syndrome de Bloom est une maladie génétique dans laquelle le gène *Blm*, codant pour une hélicase, est muté. Les patients présentent notamment une importante instabilité génomique qui les prédisposent au développement cancéreux. BLM est impliqué dans la recombinaison homologe via Rad51. La perte de ce gène altère alors le HR qui est ainsi compensé par une plus forte activité du NHEJ. Une utilisation accrue du NHEJ, mécanisme de réparation infidèle, est responsable d'une augmentation de l'instabilité chromosomique causant des réarrangements et délétions de chromosomes, potentiellement oncogéniques, caractéristiques de ce syndrome (Gaymes et al., 2002).

Bien que le NHEJ semble favoriser les réarrangements chromosomiques, il reste néanmoins un mécanisme important pour l'intégrité du génome. En effet, à l'inverse, la perte de ce mécanisme impacte tout autant la stabilité du génome. Lorsque le NHEJ est inactif ou ne peut réparer des cassures de l'ADN, la cellule se dirige alors vers l'apoptose, notamment médiée par p53. Les souris déficientes en un des gènes impliqués dans le NHEJ et ayant *p53* muté, présentent une accumulation d'aberrations chromosomiques conduisant à un développement accru de tumeurs (Frank et al., 2000; Gao et al., 2000).

D'un point de vue pathologique, une inactivation du NHEJ causée par une mutation dans l'un des gènes clés de ce mécanisme, entraîne des maladies dans lesquelles sont souvent décrits des problèmes immunitaires dus à son implication dans la recombinaison V(D)J (van Gent and van der Burg, 2007). Par exemple, dans le syndrome d'Omenn (mutation d'*Artémis*), les patients présentent, entre autre une immunodéficience et des troubles inflammatoires.

Les mécanismes du NHEJ, si importants pour la cellule, nécessitent une régulation fine étant donné qu'aussi bien une inactivation qu'une activation accrue augmente l'instabilité chromosomique et le risque de développer des tumeurs. D'un point de vue thérapeutique, il serait alors intéressant, pour les patients présentant, par exemple un syndrome de Bloom, dont le NHEJ est sur-activé par absence de HR, de favoriser l'entrée des cellules en apoptose plutôt qu'en réparation, éventuellement par une inhibition du NHEJ. A l'inverse, pour les cas présentant une inactivation de l'apoptose, il faudrait pouvoir favoriser la réparation par le HR, plus fidèle, plutôt que le NHEJ.

Pour chaque type de cassure ou altération de l'ADN, un mécanisme de réparation bien précis se met en marche pour tenter de les réparer. Ces mécanismes doivent être finement régulés afin de prévenir le risque de génération de mutation dans l'ADN, potentiellement dangereuse pour l'intégrité de la cellule. Au cours de ma thèse, j'ai pu mettre en évidence **une voie de régulation du C-NHEJ par CDX2**.

## OBJECTIFS

---

Nous avons vu que l'expression du gène homéotique *Cdx2*, normalement exprimé dans l'épithélium intestinal, est réduite et hétérogène dans les CCR et qu'il y exerce une fonction de suppresseur de tumeur. A l'inverse, dans la lignée hématopoïétique, où il n'est normalement pas exprimé, il est exprimé de manière ectopique dans les leucémies aiguës et s'y comporte comme un oncogène.

*Cdx2* exerce donc deux fonctions opposées : celle de suppresseur de tumeur dans le côlon où il est normalement exprimé et celle d'oncogène dans un contexte d'expression ectopique, tel que dans les leucémies aiguës. Un même gène peut donc exercer des fonctions opposées suivant le tissu où il est exprimé.

Nous avons également vu que deux gènes homéotiques, appartenant donc à la même famille, peuvent avoir deux fonctions opposées dans un même tissu. C'est entre autre le cas de *Cdx2*, suppresseur de tumeur et *Hoxb7*, oncogène, dans l'épithélium intestinal.

- ❖ Mon objectif de thèse est donc dans un premier temps de **comprendre la dualité de fonctions de *Cdx2*** : suppresseur de tumeur dans l'intestin et oncogène dans le sang. Qu'est ce qui est responsable de ces deux fonctions opposées ? Qu'est ce qui est différent entre ces deux types cellulaires intestinaux et hématopoïétiques ? Notre hypothèse est que CDX2 interagit avec des partenaires spécifiques. Afin de vérifier cette hypothèse, une analyse comparative des partenaires de *Cdx2* dans le côlon et dans les leucémies a été réalisée.
  
- ❖ Mon second objectif est de **comprendre comment deux protéines homéotiques, pourtant de la même famille, peuvent avoir deux rôles opposés dans un même tissu**. Qu'est ce qui les différencie ? Quel est leur mode d'action ? Pour cela, une étude descriptive et mécanistique a été entreprise dans l'épithélium intestinal et dans des lignées de cellules cancéreuses coliques. Cette étude nous a permis également de mieux comprendre le mode d'action de *Cdx2* dans sa fonction suppresseur de tumeur.

## RESULTATS

---

## Chapitre I : La dualité de Cdx2

Renouf, B., Soret, C., Saandi, T., Delalande, F., Martin, E., Vanier, M., Duluc, I., Gross, I., Freund, J.-N. and Domon-Dell, C. (2012). Cdx2 homeoprotein inhibits non-homologous end joining in colon cancer but not in leukemia cells. *Nucleic Acids Res.* 40, 3456–3469.

### 1. *Cdx2*, un gène, deux fonctions opposées, hypothèse

*Cdx2* exerce une fonction de suppresseur de tumeur dans l'épithélium intestinal alors qu'il agit en tant qu'oncogène dans la lignée hématopoïétique.

**Comment une même protéine peut-elle avoir deux rôles opposés dans deux lignées cellulaires d'origine différente ?**

L'activité d'un facteur de transcription peut être modulée de différentes manières : en régulant sa transcription, en rendant plus au moins accessibles ses cibles par des modifications épigéniques, par différentes modifications post-traductionnelles (phosphorylation, parylation, acétylation, méthylation) ou encore en interagissant avec des partenaires protéiques différents.

L'hypothèse que nous avons émise au laboratoire est que **CDX2 interagit avec des partenaires différents dans la lignée leucémique par rapport à l'épithélium intestinal**. De ces interactions spécifiques en résultent alors les fonctions opposées de *Cdx2*, suppresseur de tumeur dans le côlon, oncogène dans la lignée hématopoïétique.

### 2. CDX2 inhibe le NHEJ dans les CCR et pas dans les leucémies

La recherche des partenaires protéiques de CDX2 par la technique de purification en Tandem (TAP-Tag), révèle la présence d'une interaction avec notamment deux protéines, spécifiquement dans les lignées cancéreuses coliques et non dans les cellules leucémiques testées. Ces partenaires ont été identifiés par spectrométrie de masse comme étant les protéines de réparation KU70/80,



protéines ubiquitaires intervenant dans la réparation des cassures de l'ADN par le mécanisme du NHEJ classique.

En résumé, nous montrons dans ce papier :

- **Une interaction entre CDX2 et KU** : l'interaction est confirmée par co-immunoprécipitation et par la technique de PLA (Proximity Ligation Assay) dans les cellules cancéreuses coliques, de même que l'absence d'interaction dans les lignées leucémiques, bien qu'exprimant les protéines KU70/80.
- **La cartographie de l'interaction** : des mutants de délétion pour CDX2 ont permis de mettre en évidence, par co-immunoprécipitation, que CDX2 interagit avec les protéines KU70/80 au niveau de la troisième hélice  $\alpha$  son homéodomaine.
- **Les fonctions biologiques** : cette interaction peut avoir notamment deux conséquences. La première est que les protéines KU70/80 modifient l'activité de facteur de transcription de CDX2 ; la deuxième est que CDX2 modifie, à l'inverse, l'activité des protéines KU. L'analyse de l'activité transcriptionnelle de CDX2 sur ses gènes cibles en présence de KU70 et/ou KU80 ne révèle aucune modification de cette activité par les protéines KU. En revanche, des tests de réparation des cassures double-brins de l'ADN montrent une action inhibitrice de CDX2 sur ce mécanisme dépendant de KU70/80 et ce, spécifiquement dans les lignées cancéreuses coliques et pas dans les lignées leucémiques testées. De plus, l'utilisation des mutants de délétion montre que CDX2 ne nécessite pas son domaine de transactivation pour inhiber la réparation mais que son homéodomaine est indispensable.
- **Un mécanisme d'action de CDX2 sur la réparation** : CDX2 ne modifie pas le recrutement de KU70/80, ni celui de la DNA-PKcs sur les bouts d'ADN lésés. Il n'y induit pas non plus de modification de l'autophosphorylation de la DNA-PK. En revanche, l'activité de la DNA-PK, démontrée par la phosphorylation de sa cible p53, est réduite en présence de CDX2.
- **Les conséquences physiologiques sur la survie de la cellule** : l'induction de l'expression de CDX2 s'accompagne d'une réduction de la survie des cellules cancéreuses coliques après traitement avec un agent chimique endommageant l'ADN, contrairement aux cellules leucémiques dans lesquelles CDX2 n'interagit pas avec KU70/80.

Ces résultats sont regroupés dans un article sur lequel je suis second auteur. Ma contribution à ce travail a été de confirmer, d'une part, les interactions par co-immunoprécipitation et par PLA et d'autre part, l'inhibition de la réparation par CDX2. J'ai également construit les mutants de délétion que j'ai utilisés en co-immunoprécipitation, ce qui m'a permis de cartographier l'interaction, et dans les tests de réparation *in vitro* et *in vivo*. J'ai réalisé les tests d'activité de la DNA-PK sur p53 et les tests d'activité transcriptionnelle en luciférase et en RT-PCR. Enfin, j'ai testé les formes sauvages et mutantes de CDX2 dans les tests de survie des cellules cancéreuses coliques.

# Cdx2 homeoprotein inhibits non-homologous end joining in colon cancer but not in leukemia cells

Benjamin Renouf<sup>1,2</sup>, Christine Soret<sup>1,2</sup>, Thoueiba Saandi<sup>1,2</sup>, François Delalande<sup>2,3</sup>, Elisabeth Martin<sup>1,2</sup>, Marie Vanier<sup>1,2</sup>, Isabelle Duluc<sup>1,2</sup>, Isabelle Gross<sup>1,2</sup>, Jean-Noël Freund<sup>1,2</sup> and Claire Domon-Dell<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>INSERM, U682, F-67200 Strasbourg, <sup>2</sup>Université de Strasbourg, Faculté de Médecine, F-67081 and <sup>3</sup>CNRS, LSMBO, F-67200 Strasbourg, France

Received June 9, 2011; Revised November 28, 2011; Accepted November 30, 2011

## ABSTRACT

**Cdx2, a gene of the paraHox cluster, encodes a homeodomain transcription factor that plays numerous roles in embryonic development and in homeostasis of the adult intestine. Whereas Cdx2 exerts a tumor suppressor function in the gut, its abnormal ectopic expression in acute leukemia is associated to a pro-oncogenic function. To try to understand this duality, we have hypothesized that Cdx2 may interact with different protein partners in the two tissues and set up experiments to identify them by tandem affinity purification. We show here that Cdx2 interacts with the Ku heterodimer specifically in intestinal cells, but not in leukemia cells, via its homeodomain. Ku proteins do not affect Cdx2 transcriptional activity. However, Cdx2 inhibits *in vivo* and *in vitro* the DNA repair activity mediated by Ku proteins in intestinal cells. Whereas Cdx2 does not affect the recruitment of Ku proteins and DNA-PKcs into the DNA repair complex, it inhibits DNA-PKcs activity. Thus, we report here a new function of Cdx2, acting as an inhibitor of the DNA repair machinery, that may contribute to its tumor suppressor function specifically in the gut.**

## INTRODUCTION

The Cdx2 gene, a member of the paraHox cluster, plays numerous roles in embryos including trophectoderm differentiation, posterior elongation and patterning, and intestinal determination (1–3). By midgestation onwards, it becomes restricted to the intestinal epithelium and is later involved in the homeostasis of the adult gut (4–6). The primary function of Cdx2 depends on its activity of DNA-binding transcription factor (7), but recent data suggest that it can also act via non-conventional

mechanisms. For instance, it interacts with Smad3 to activate TGF $\beta$  reporter systems in the absence of TGF $\beta$  (8). Cdx2 is also able to interact with the p65 subunit of NF $\kappa$ B and therefore prevent the NF $\kappa$ B binding and activation of the Cox-2 promoter (9,10). Similarly, by interacting with  $\beta$ -catenin, and consequently preventing the recruitment of  $\beta$ -catenin on Tcf4, Cdx2 interferes with Wnt signalling (11). Recently, Cdx2 has also been reported to inhibit cell proliferation by stabilizing the cell cycle regulator p27Kip1 independently of its DNA-binding activity (12).

Cdx2 deregulation has several outcomes in pathological situations. In the normal site of expression, the gut, it becomes reduced and heterogeneous in human colorectal cancers. Experimentally, the reduced expression of Cdx2 in Cdx2<sup>+/-</sup> mice facilitates tumor progression in models of genetically and chemically induced intestinal cancers (13–14), and it also increases the migration and dissemination of colon cancer cells (15). Together, these data led to attribute a tumor suppressor role to Cdx2 in the gut. However, beside the gut, Cdx2 is ectopically expressed in a number of pathologies including acute leukemia, where it has been described as an oncogene since forced expression in haematopoietic progenitors induces leukemia (16,17). Thus, Cdx2 has opposite effects depending on the tissue context in sites of normal or ectopic expression.

Interestingly, the susceptibility of Cdx2<sup>+/-</sup> mice to intestinal cancer has been correlated to a higher resistance of the colon epithelium to  $\gamma$ -irradiation-induced apoptosis and to an increased chromosomal instability (13,14). In line with this, Cdx2 suppresses cell proliferation by blocking G0/G1-S progression at the first DNA checkpoint (12). These observations open the possibility that Cdx2 may have a role in genome maintenance and DNA repair. Double-strand DNA breaks (DSBs) induced by many pro-oncogenic stresses, like oxidative stress or radiations, play a major role in cancer. Indeed, massive unrepaired DSBs lead to cell cycle arrest or apoptosis

\*To whom correspondence should be addressed. Tel: +33 388 27 77 27; Fax: +33 388 26 35 38; Email: claire.domon@inserm.fr

whereas misrepaired DSBs induce neoplastic transformations due to chromosomal translocation or mutations (18). In higher eukaryotes, the non-homologous DNA end-joining (NHEJ) repair mechanism prevails when DSBs occur, notably during G1 phase of the cell cycle (19). During this process, the Ku antigen heterodimer (Ku70/Ku80) recognizes broken DNA ends and allows the recruitment of the repair machinery, including DNA-PK and ligase IV. The lack of either Ku antigen or DNA-PK large catalytic subunit (DNA-PKcs) contributes to high radiosensitivity, immunodeficiency and premature aging (20–22).

The reason why Cdx2 has opposite effects in various pathological settings, especially in colon cancers and leukemia, remains elusive. One possibility is that the function of this homeoprotein depends on the cellular context, or in other words that Cdx2 interacts with different partners in different tissues, leading to different effects. In the present work, we challenged this hypothesis, which allowed us to identify the Ku heterodimer as a partner of Cdx2 specifically in intestinal cells but not in leukemia cells. Functional studies provided evidence for a new and unexpected role of the Cdx2 protein, as a regulator of the DNA repair machinery.

## MATERIELS AND METHODS

### Cell lines, plasmids and cell transfections

HCT116, SW480, K562 and Nalm6 were grown as recommended (40–43). HT29-TW6, -TW10 or -TG8 cells have been described previously (15). pFlag-Cdx2 and pFlag-miniCdx2 have been described (26) pFOXO4 and 6DBE-luc plasmids have been described (27). Mutant plasmids were prepared in pFlag2 vector (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). DNA fragments were amplified from pFlag-Cdx2 using the 5' primer AAAAAGCTTTCCCTCGGCAGCCAAGTGAAA and the 3' primers AAAAGATCTAGTTCCCGAGACCCTGTGAAG and AAAAGATCTACGGCGACGTCTTGGGGCCA for Cdx2[175-250] and Cdx2[175-313], respectively, and the 5' primer AAAAAAGCTTTACGTGAGCTACCTCCTGGACAAGG and 3' primer AAAAGATCTCGTTGAGAAGAACAATAAAAAGG for Cdx2[1-220]. pCTAP-Cdx2 was prepared by cloning the human Cdx2 cDNA amplified with the primers 5'AAAAGCTTGCCACCATGTACGTGAGCTACTCCTGGACAAGGACG 3', 5'AAAGTCGACCTGGGTGACGGTGGGGTTTAGCA 3' into HindIII/SalI digested pCTAP-A vector (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). For SI-luc and CDH17-luc plasmids construction, the two promoter regions were amplified from human DNA using primers AAAGAGCTCCACAGCTTTGAGAAATCAAAGA and AAAAAGCTTGCCTGTTCTCTTTGCTATGTTG T for SI promoter and AAAGAGCTCTTCACTTGCAGGGTCTCAGG and AAAAAGCTTTCGAGACTCTTGCTACGACTGGA for CDH17 promoter. DNA were then cloned into SacI and HindIII sites of pGI3-basic vector (Promega, Madison, WI) Underlined sequences indicate restriction sites inserted and used for cloning. Colon cancer cells transfections were performed

using JetPEI (Polyplus Transfection, Illkirch, France) or Lipofectamin2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and leukemia cells were nucleofected using the Amaxa system (program X1; Lonza, Basel, Switzerland), as recommended by the suppliers in Viaspan buffer (Bristol-Myers Squibb Pharmaceuticals, Dublin, Ireland).

### Luciferase activity measurement

For luciferase activity measurement,  $1.5 \times 10^5$  cells were co-transfected with 100 ng of reporter plasmid (SI-luc and CDH17-luc) together with 10 ng of Cdx2 and Ku70, Ku80 encoding plasmids when indicated 200 ng of reporter 6DBE-luc together with 200 ng of FOXO4 and Ku70 encoding plasmids when indicated. pRL-null was used as internal control (Promega, Madison, WI, USA). Firefly and Renilla luciferase activities were measured using a dual reporter luciferase assay (Promega, Madison, WI) with a Lumistar luminometer (BMG, Offenburg, Germany) 48 h after DNA transfection. Each transfection experiment was repeated at least three times in triplicate. Firefly luciferase activity was normalized with Renilla luciferase activity.

### Antibodies and western blot

Proteins separated on SDS-PAGE were analyzed by western blot using different primary antibodies: mouse monoclonal anti-Cdx2 (CDX2-88, BioGenex, San Ramon, CA, USA; 1/2000), goat polyclonal anti-Ku70 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA; 1/2000), rabbit polyclonal anti-Ku70 (Millipore, Billerica, MA, USA; 1/5000), mouse monoclonal anti-Ku70 (S5C11, Abcam, Cambridge, MA, USA; 1/10 000), rabbit monoclonal anti-Ku80 (EPR3468, Abcam, Cambridge, MA, USA; 1/10 000), mouse monoclonal anti-Flag (M2 affinity purified, Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA; 1/4000), rabbit polyclonal anti-DNA-PKcs (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA; 1/200), rabbit polyclonal anti S2056-phosphorylated DNA-PKcs (Abcam, Cambridge, MA, USA; 1/200), mouse monoclonal anti- $\beta$ -actin (C4, Millipore, Billerica, MA, USA; 1/25 000). HRP-conjugated anti-mouse or anti-rabbit secondary antibodies (GE company, Fairfield, CT, USA) were used before ECL detection (GE company, Fairfield, CT, USA).

### Cell survival assay of colon cancer cells

HCT116 cells ( $3 \times 10^6$ ) were transfected for 24 h or HT29-TW6, -TW10 or -TG8 cells were treated with vehicle or doxycyclin ( $1 \mu\text{g} \mu\text{l}^{-1}$ ; Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) for 24 h. Cells were washed in PBS and treated by  $20 \mu\text{M}$  etoposide (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) containing medium for 24 h (with  $1 \mu\text{g} \mu\text{l}^{-1}$  of doxycyclin for HT29 cells). Cells were trypsinized and  $1 \times 10^6$  cells were seeded in culture medium (with  $1 \mu\text{g} \mu\text{l}^{-1}$  doxycyclin for HT29), grown in  $25 \text{ cm}^2$  for 2 weeks. Adherent cells were fixed with 70% ethanol, stained with 0.1% crystal violet and colonies were estimated by ImageJ software (W Rasband, Bethesda, MA, USA).

### Cell survival analysis in leukemia cancer cells

Nalm6 or K562 cancer cells ( $5 \times 10^6$  cells) were nucleofected with  $5 \mu\text{g}$  plasmid and cultured for 24 h for recovering. Nucleofected cells were treated with  $60 \mu\text{M}$  of etoposide for 24 h. Apoptotic cell number was estimated at indicated time point on the FACScalibur machine (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) using a green-versus-red fluorescent plot after staining cells 10 min with  $2.5 \mu\text{g ml}^{-1}$  FITC-labeled annexin V (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) in buffer AP (10 mM HEPES/NaOH, pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1.8 mM  $\text{CaCl}_2$ ) supplemented with  $10 \mu\text{g ml}^{-1}$  propidium iodide (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA). Annexin V positive cells (PI negative and positive) were considered as dead cells.

### *In situ* protein–protein interaction assay (DuoLink<sup>®</sup>)

SW480 cells seeded in eight-well CultureSlides (BD Biosciences, Mountain View, CA, USA) were fixed (PFA 4%, 15 min) and permeabilized (Triton X-100 0.5% in PBS, 30 min). Slides were processed for *in situ* Proximity Ligation Assay following manufacturer's instructions using the DuoLink<sup>®</sup> II Detection Reagents Green, DuoLink<sup>®</sup> II PLA probe anti-Mouse Plus, DuoLink<sup>®</sup> II PLA probe anti-Rabbit Minus (Olink Bioscience, Uppsala, Sweden), and mouse anti-Cdx2, and rabbit anti-Ku70 or rabbit anti-Ku80 as primary antibodies. To check the specificity of the PLA signal, control experiments omitting one of the primary antibodies were performed. Imaging was performed using an Imager.Z2 microscope and Axiovision software (Zeiss, Jena, Germany). Nuclei were labeled with DAPI  $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ .

### Tandem affinity purification (TAP-Tag)

For tandem affinity purification of Cdx2 containing complex, we used the InterPlay<sup>®</sup> mammalian TAP system (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). For purification,  $12 \times 10^6$  HCT116 were transfected with  $72 \mu\text{g}$  of pCTAP or pCTAP-Cdx2,  $24 \times 10^6$  SW480 with  $96 \mu\text{g}$  of pCTAP or pCTAP-Cdx2 and  $100 \times 10^6$  NALM6 or K562 cells were nucleofected with  $5 \mu\text{g}$  of pCTAP or pCTAP-Cdx2 for  $5 \times 10^6$  cells. Double-tagged protein was recovered according to manufacturer's protocol. Proteins were eluted in  $125 \mu\text{l}$  of  $2 \times$  laemmli buffer and boiled. The recovered proteins were separated on a 14-cm long 7.5–15% gradient gel together with a prestained protein ladder (Euromedex, Strasbourg, France), silver stained (PlusOne<sup>™</sup> Silver Staining Kit, GE company, Fairfield, CT, USA) and analyzed by mass spectrometry. Gel slices containing protein bands of interest were excised and processed as described previously (44). After digestion, the resulting peptide extracts were directly analyzed by nanoLC-MS/MS using an Agilent 1100 series nanoHPLC-Chip/MS system (Agilent Technologies, Palo Alto, USA) coupled to a HCT Plus ion trap (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Mass data collected during the nanoLC-MS/MS analysis were processed and converted into \*.mgf files using the DataAnalysis 3.3 Build 146 software (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). The

MS and the MS/MS data were searched using a local Mascot server (MASCOT 2. 2.0, MatrixScience, UK) against a composite target-decoy database including the SwissProt 55.5 protein sequences. Mascot results were loaded in MuDPIT mode into the Scaffold 2.00.03 software (Proteome Software, Portland, USA).

### Immunoprecipitation

Cells were rinsed with PBS and lysed for 30 min in lysis buffer [10 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 1% NP-40, 1 mM EGTA and protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)]. The lysate was centrifuged at  $20\,000g$  for 20 min at  $4^\circ\text{C}$ . One mg of protein was incubated with  $2 \mu\text{g}$  of primary antibodies in 1 ml of lysis buffer overnight at  $4^\circ\text{C}$  with gentle rocking. Immunoprecipitations were performed with  $30 \mu\text{l}$  of 50% G- or A-agarose beads (Roche Applied Science) for 2 h at  $4^\circ\text{C}$ . Immunoprecipitates were washed twice with lysis buffer, twice with lysis buffer containing 500 mM NaCl and eluted using SDS-PAGE sample loading buffer (Biorad, Hercules, CA, USA). When precised, HCT116 cell extracts ( $1 \text{ mg ml}^{-1}$ ) were treated for 30 min with  $400 \mu\text{g ml}^{-1}$  Ethidium Bromide (EtBr) prior to addition of antibodies.

### *In vivo* reparation assay

pEGFP-Pem1-Ad2 plasmid was kindly provided by G. Iliakis (Essen, germany). HindIII restricted pEGFP-Pem1-Ad2 was purified using Qiagen PCR purification kit (Qiagen, Hilden, Germany), ethanol precipitated and resuspended in water. One day after splitting, exponentially growing cells were transfected with 10 ng of digested plasmid pEGFP-Pem1-Ad2, 10 ng of pCherry (Clontech, Mountain View, CA, USA) as an internal control and  $0.8 \mu\text{g}$  of pFlag or wt/mutant Cdx2 encoding plasmid. Cells were analyzed on the FACScalibur machine (BD Biosciences, Mountain View, CA) using a green-versus-red fluorescent plot. Cells with repaired pEGFP-Pem1-Ad2 DNA are identified in the up-right panel. Results are represented as the percentage of green and red cells in the red cells population.

### *In vitro* DNA repair assay

Cell free extract was prepared as described (45). Briefly, 48 h after transfection,  $3 \times 10^7$  cells were washed in cold PBS, resuspended in four packed cell volumes of cold hypotonic lysis buffer A (10 mM Tris-HCl pH 7.6, 1 mM DTT, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM EDTA and protease inhibitors), incubated for 40 min on ice and then disrupted using a Dounce homogenizer (40 strokes). Subsequently, sucrose was added to reach a final concentration of 250 mM. The extract was homogenized and centrifuged 10 min at  $1000g$  to discard cell debris, and then washed again in the hypotonic lysis buffer containing 250 mM sucrose. Nuclear pellet was then resuspended in two volumes of nuclear extraction buffer B (20 mM Tris-HCl pH 7.6, 1 mM DTT, 2 mM EDTA, 20% glycerol, 500 mM NaCl and protease inhibitors) and incubated for 30 min on ice. Nuclear extracts were then clarified 30 min at

21 000 g and dialysed overnight against dialysis buffer D (20 mM Tris-HCl pH 7.6, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 20% glycerol, 25 mM NaCl and 0.2 mM PMSF).

End-joining reaction was performed in a final volume of 30  $\mu$ l by incubating 50 ng of BamHI digested pcDNA3 plasmid with 5  $\mu$ g of nuclear extract for 1 h at 37°C in buffer E (50 mM Tris-HCl pH 7.6, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM ATP, 1 mM DTT, 50  $\mu$ M dNTP, 80 mM NaCl and protease inhibitors). Reaction was stopped by RNase treatment (0.25  $\mu$ g  $\mu$ l<sup>-1</sup> of RNase for 10 min at 37°C) followed by a proteinase K treatment (0.5% SDS, 50 mM EDTA and 1  $\mu$ g  $\mu$ l<sup>-1</sup> of proteinase K at 37°C for 1 h). DNA was purified by phenol and chloroform extraction and recovered by ethanol precipitation, separated on a 0.85% agarose gel at 2 V cm<sup>-1</sup> and visualized by UV light.

Wortmanin (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) was prepared in DMSO at 10 mM and diluted in 10% DMSO to 20  $\mu$ M immediately before use. Diluted wortmanin (1  $\mu$ l) was added to the reaction and incubated for 10 min at 4°C prior the addition of ATP and DNA.

### DNA ends-binding activity of Ku70

Preparation of nuclear extracts and assessment of DNA ends-binding activity of Ku70 were carried out using a Nuclear Extract kit and a Ku70/Ku80 DNA Repair Protein ELISA kit (Active Motif, Carlsbad, CA, USA). In brief, 3  $\times$  10<sup>6</sup> HCT116 cells were transfected with 8  $\mu$ g of pFlag or pFlag-Cdx2 plasmid and nuclear proteins were extracted following the kit instructions. Equivalent amounts of proteins (5  $\mu$ g) from each lysate were loaded into wells coated with blunt ends linear oligonucleotides that can be specifically bound by Ku70 protein. Amount of bound Ku70 was quantified by using the provided anti-Ku70 primary antibody and the secondary HRP-conjugated antibody in a sensitive colorimetric assay using the Universal Microplate Reader EL800UV (Biotek Instruments, Winooski, VT, USA).

### DNA-PKcs activity assay

At 48 h after Cdx2 induction by Doxycyclin, cells were treated with etoposide (50  $\mu$ M), neocarzinostatin (200 ng ml<sup>-1</sup>; Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) or DMSO for 1 h. The amount of p53 phosphorylated on serine 15 is measured following the PathScan<sup>®</sup> Sandwich ELISA Kit instructions (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA). Briefly, an aliquot of 10 ng ml<sup>-1</sup> of cell extract is added to a microwell coated with p53 antibodies and incubated overnight at 4°C. The amount of phospho-p53 is quantified by spectrophotometry by using a phosphoSer15-p53 specific antibody revealed by the provided HRP-conjugated secondary antibody. The absorbance is read at 450 nm with the Universal Microplate Reader EL800UV (Biotek Instruments, Winooski, VT, USA).

### RT-qPCR

Total RNA was isolated using TRI-Reagent (Ambion Applied Biosystem, Houston, TX, USA). For reverse transcription, we used the high capacity reverse transcription kit (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) and

2  $\mu$ g of RNA. For qPCR, we used TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA), TaqMan human TBP, CDH17 and SI probes (TBP, Hs9999910\_m1; CDH17, Hs00184865\_m1; SI, Hs00356112\_m1; Applied Biosystems, Carlsbad, CA), and 7500 Real-Time PCR system (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). Results analysis was performed using the Applied 7500 Software v2.0.1.

### Statistics

The results were analyzed using GraphPad Prism version 5.0. Mean of results of at least three independent experiments with SEM is generally represented. The statistical difference of the mean was analyzed using Student's paired two-tailed *t*-test.

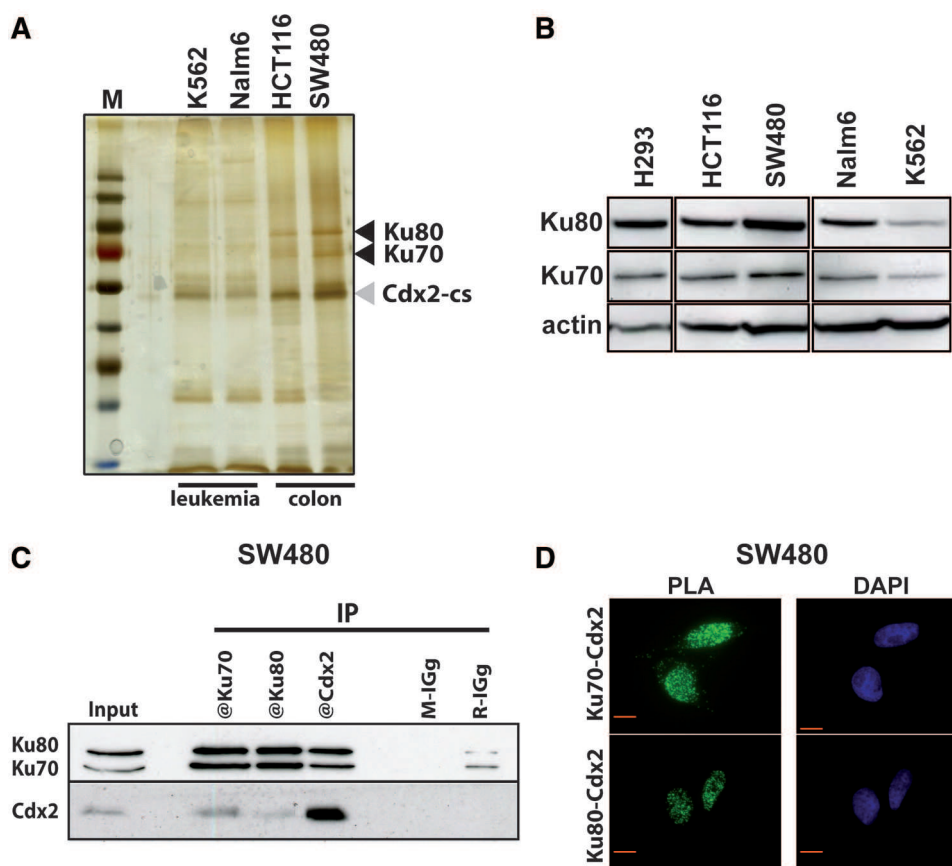
## RESULTS

### Identification of Ku70/Ku80 proteins as specific partners of Cdx2 in intestinal cells

In an attempt to identify Cdx2 interacting proteins, we used the TAP-Tag technology (Tandem Affinity Purification). For this purpose, we expressed a double tagged Cdx2 protein, containing at its C-terminus end CBP (Calmodulin Binding Protein) and SBP (Streptavidin Binding Protein) motives, in two human colon cancer cell lines that express endogenous Cdx2 either at high (SW480) or low levels (HCT116), and in two leukemia cell lines that also express Cdx2 at intermediate (Nalm6) or very low levels (K562). The purified proteins were separated on SDS-polyacrylamide gels and silver stained. This revealed distinct patterns in intestinal and leukemia cells, mainly in the region corresponding to proteins of 70–90 kDa. Indeed, two bands appeared in this region in both intestinal cell lines but were virtually absent in the two leukemia cell lines (Figure 1A). Mass spectrometry analysis of the proteins present in this region identified the Ku70 and Ku80 proteins, specifically in the intestinal cells as opposed to leukemia cells. This result combining TAP-Tag purification and mass spectrometry analysis was repeated in three separate experiments.

We wondered whether the different Cdx2 interaction patterns observed in intestinal and leukemia cells resulted from a different level of expression of Ku70 and Ku80 in these cells. Western blot analysis revealed that both proteins were expressed at nearly similar levels in intestinal and leukemia cells (Figure 1B), indicating that the absence of interaction with Cdx2-CBP-SBP in leukemia cells did not reflect a loss of Ku70 or Ku80 expression, but instead a differential interaction capacity.

The interaction of Cdx2 with Ku70/80 uncovered by TAP-Tag purification in intestinal cells used transfected cells to produce high levels of Cdx2-CBP-SBP. Two series of experiments were performed to rule out any technical artifact and to actually demonstrate the interaction at the level of the endogenous proteins. For this purpose, we used the intestinal SW480 cells that express both Ku70/80 and Cdx2 proteins. First, coimmunoprecipitations of endogenous proteins were performed. As illustrated in Figure 1C, antibodies raised against Ku70 or Ku80



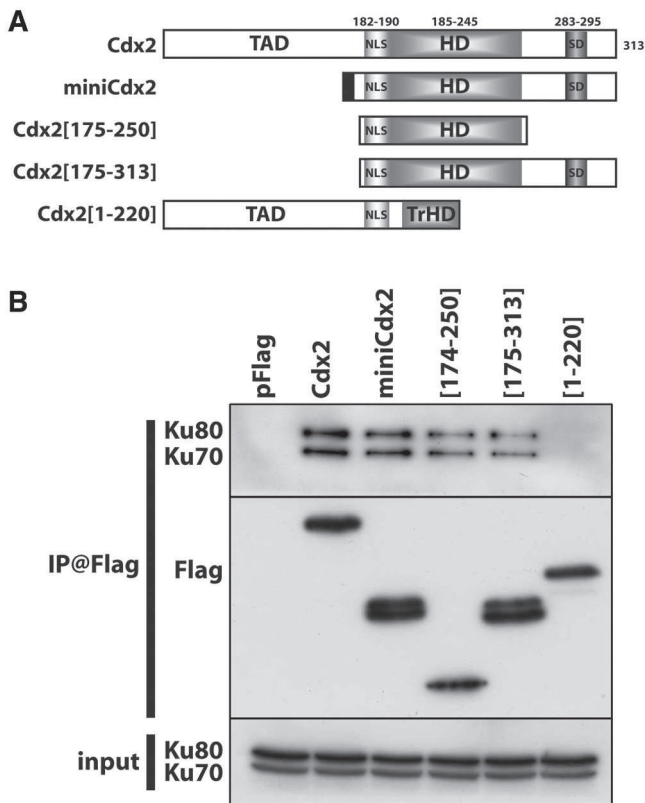
**Figure 1.** Cdx2 interacts with Ku70/Ku80 proteins. (A) Silver-stained protein gel obtained after tandem affinity purification from K562, Nalm6, HCT116 and SW480 cells transfected with pCTAP-Cdx2. M: molecular weight protein ladder. Cdx2-CBP-SBP (Cdx2-cs) and Ku70/Ku80 proteins are indicated with gray or black arrowheads, respectively. (B) Western blot revealing the presence of Ku70 and Ku80 proteins in all studied cell lines. Nearly 20  $\mu$ g of total proteins were separated on a gradient SDS-PAGE. Actin was used as loading control. (C) Coimmunoprecipitation of endogenous Cdx2 and Ku proteins. SW480 extracts were prepared and Cdx2, Ku70 or Ku80 were immunoprecipitated using corresponding antibodies. Mouse IgG (M-IgG) or rabbit IgG (R-IgG) were used as negative control. Western blot was revealed using rabbit anti-Ku70 and rabbit anti-Ku80 in the upper panel and using mouse anti-Cdx2 in the lower panel. About 20  $\mu$ g of protein extracts were loaded in the input line. (D) *In situ* proximity ligation assay. Mouse anti-Cdx2 and rabbit anti-Ku70 (left panel) or mouse anti-Cdx2 and rabbit anti-Ku80 antibodies (right panel) were used to reveal endogenous proteins in SW480 cells. Green fluorescence corresponds to the PLA positive signal and indicates that the two molecules belong to the same protein complex; blue fluorescence corresponds to nuclei (DAPI staining). Red bar is 10  $\mu$ m.

were able to coimmunoprecipitate Cdx2, and reciprocally, anti-Cdx2 antibody coimmunoprecipitated the Ku70 and Ku80 proteins. These results were confirmed in DLD1, an intestinal cell line that also expresses endogenous Cdx2 at a relatively high level, and in HT29 and HCT116 cells after overexpression of Cdx2 since these two intestinal cell lines express only barely detectable levels of endogenous Cdx2 (Supplementary Figure S1 and Figure 2). Second, we used the Proximity Ligation Assay (PLA) technology that is appropriate to reveal the proximity of two proteins *in situ* in the cells (23). The Figure 1D shows that both anti-Ku70 and anti-Ku80 antibodies produced a positive fluorescent signal in the nuclei of SW480 cells when combined with anti-Cdx2 antibody, indicating the interaction of the two proteins in this cell compartment. Altogether, these results demonstrate that the Ku70, Ku80 and Cdx2 proteins can associate within a same nuclear multiprotein complex in intestinal cells.

Coimmunoprecipitations performed in Nalm6 and K562 leukemia cells failed to reveal any interaction between Cdx2 and Ku proteins, consistent with the absence of the Ku protein in the TAP-Tag experiments (Supplementary Figure S1).

#### Cdx2 interacts with Ku70/Ku80 via the third $\alpha$ -helix of the homeodomain

Two homeoproteins of the Hox clusters, HoxB7 and HoxC4, have been shown to interact with Ku70, and the homeodomain was demonstrated to be essential for this interaction (24,25). To delineate the domain of interaction with Ku proteins within the Cdx2 homeoprotein, we constructed plasmids encoding truncated forms of Cdx2, which were all Flag-tagged at their N-terminus: the miniCdx2 form corresponds to a splicing variant of Cdx2 in which the transactivation domain is replaced by a 13 amino acids extension at its N-part (26); the mutant



**Figure 2.** The homeodomain of Cdx2 is necessary for its interaction with Ku70/Ku80. (A) Schematic representation of the different Cdx2 deletion mutants tested. TAD: transactivator domain; NLS: nuclear localization signal; HD: homeodomain; SD: stabilization domain. The upper numbers represents the position of the different domains in the 313aa long Cdx2 protein. (B) Coimmunoprecipitations of the different mutant proteins with Ku proteins. Co-IP was performed in HCT116 transfected with the indicated mutant plasmids using anti-Flag antibodies. Immunoprecipitates were separated on a SDS-PAGE and analyzed by western blot using anti-Ku70 and anti-Ku80 antibodies (upper panel), anti-Flag antibodies (middle panel). Ku70 and Ku80 proteins present in the protein extracts before immunoprecipitation were revealed by western blot (input, lower panel).

Cdx2[175–313] overlaps the homeodomain and the C-terminal regulatory region but lacks the transactivation domain; the mutant Cdx2[1–220] contains the transactivation domain and the first two  $\alpha$ -helices of the homeodomain but has lost the third  $\alpha$ -helix and the downstream regulatory region; the mutant Cdx2[175–250] contains the full-length homeodomain without the N-ter transactivation domain and the C-ter regulatory domain (Figure 2A). After transfection of these plasmids into HCT116 colon cancer cells, coimmunoprecipitation experiments were performed using anti-Flag antibody. The full-length Cdx2 protein, the miniCdx2 variant, and the mutants containing an intact homeodomain, Cdx2[175–250] and Cdx2[175–313], co-immunoprecipitated Ku70 and Ku80; however, the mutant lacking the third  $\alpha$ -helix of the homeodomain, Cdx2[1–220], did not interact with Ku proteins (Figure 2B). These data indicate that the homeodomain is involved in the interaction of Cdx2 with the Ku70/80 complex and that the third  $\alpha$ -helix is required for this interaction.

### The Ku70/Ku80 complex does not alter Cdx2 transcription activity

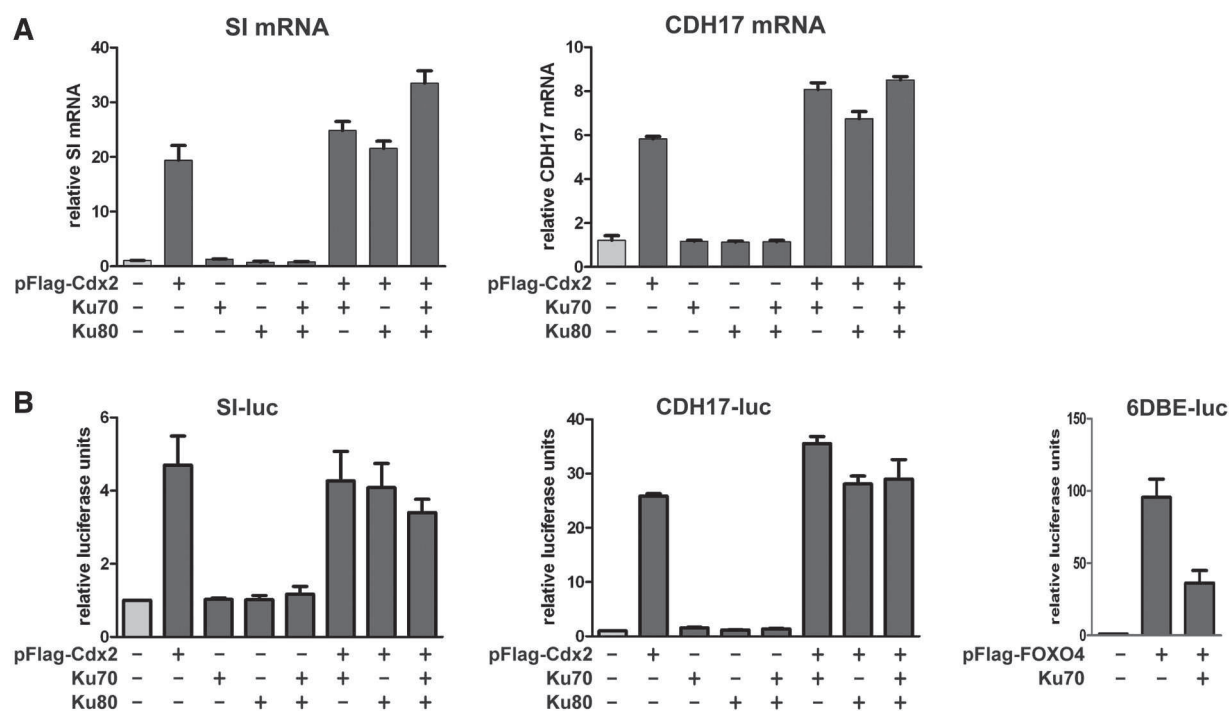
To take up the biological relevance of the interaction between Cdx2 and Ku70/80, we first addressed the issue of the impact of Ku proteins on the transcriptional activity of Cdx2. For this goal, HCT116 cells were transfected with the plasmid encoding Cdx2 together with combinations of plasmids encoding Ku70 and Ku80. Then, the expression of two well-established targets of Cdx2, the liver-intestine cadherin (CDH17) and the sucrase-isomaltase (SI) genes was analyzed by RT-qPCR. Cdx2 alone strongly stimulated the expression of both genes, and the level of stimulation was not significantly modified in the presence of Ku70 and/or Ku80 (Figure 3A). To corroborate these results, HCT116 cells were cotransfected with reporter luciferase plasmids containing the promoter of the CDH17 or SI genes with their Cdx2-responding elements. Again, Cdx2 stimulated the basal activity of these promoters, but Ku70 and/or Ku80 did not significantly change the stimulatory effect exerted by Cdx2 (Figure 3B, left and middle panels). In the same conditions, Ku70 inhibited the transcriptional activity of the FOXO4 transcription factor (Figure 3B, right panel), as previously described (27). We conclude from these data, that, albeit Ku70/80 interacts with Cdx2, it does neither stimulate nor inhibit its transcriptional activity.

### Cdx2 inhibits *in vitro* DNA repair specifically in intestinal cell lines

We then asked whether Cdx2 may affect the function of Ku70/80 proteins. The Ku70/80 heterodimer is largely involved in DNA repair. Indeed, the mechanism of DNA repair primarily activated by DSBs, namely C-NHEJ, is dependent on Ku70/80, on the wortmanin-sensitive DNA-PK and on ATP. Ku protein heterodimers bind and encircle broken DNA, allowing the recruitment of DNA-PKcs and DNA-ligase IV. Under conditions preventing the activation of C-NHEJ, for example when Ku70/80 heterodimers fail, an alternative pathway, named A-NHEJ, can be turned on to compensate the missing activity of C-NHEJ. Whereas C-NHEJ is primed by the binding of Ku70/80 on the broken DNA ends, A-NHEJ is activated in the absence of Ku70/80 by the recognition of the DNA ends by PARP-1 (28,29).

DNA repair can be assayed *in vitro* by incubating linear DNA with nuclear extracts and measuring the appearance of slow-migrating electrophoretic DNA fragments corresponding to circularized and multimeric forms (30). We set up this assay and confirmed previous data by Fattah *et al.* (28) showing that the C-NHEJ pathway is predominant in intestinal HCT116 cells since DNA repair is wortmanin-sensitive and insensitive to PARP1 antibody (Figure 4A, left). In addition, when cells were transfected with siRNA@Ku70 to deplete the nuclear extracts in Ku70, the DNA repair activity became wortmanin-insensitive, but significantly decreased in the presence of anti-PARP-1 antibody (Figure 4A, right), indicating that, in these conditions, DNA repair involves the A-NHEJ instead of the C-NHEJ pathway.





**Figure 3.** Ku proteins do not affect significantly Cdx2 transcriptional activity. (A) Stimulation of endogenous Cdx2 target genes. HCT116 were transfected with 1  $\mu$ g of each plasmid in a combined manner as indicated and RNA were extracted and analyzed by RT-qPCR using CDH17, SI or TBP TaqMan probes. Results are represented as fold induction relative to pFlag (normalized with TBP expression). Data correspond to the mean of several experiments and error bars represent SEM ( $n = 2$ ). (B) Stimulation of Cdx2 reporter plasmids. HCT116 were transfected with CDH17-luc or SI-luc reporter plasmids and with indicated expression plasmids. Protein extracts were analyzed for dual luciferase activity. Relative promoter activity (normalized with *Renilla* values) of reporter plasmid cotransfected with empty plasmids was set at 1. Data correspond to the mean of several experiments and error bars represent SEM ( $n = 3$ ). Right panel: FOXO4 transcription factor was used as positive control for Ku70 inhibition on the 6DBE-luc reporter plasmid as described in Brenkman *et al.* (27).

We used this *in vitro* DNA repair assay to investigate if Cdx2 has any effect on the NHEJ activity in intestinal cells. For this purpose, nuclear extracts were prepared from HCT116 cells transfected either with the pFlag2 vector as control or with expression plasmids encoding Cdx2 or truncated forms of the protein. As shown in Figure 4B, the DNA repair activity observed by incubating linear DNA with control nuclear extracts was inhibited when Cdx2 was present in the extracts. Omitting ATP in the reaction mix also strongly compromised DNA repair activity. Consequently, since Cdx2 inhibits the overall DNA repair activity while Ku70/80 is present in the nuclear extracts, we concluded that Cdx2 compromises C-NHEJ activity without turning on the A-NHEJ pathway.

To strengthen this conclusion, we analyzed the dependency of the inhibitory effect exerted by Cdx2 on the interaction between Cdx2 and Ku70/80. DNA repair activity determined using the *in vitro* assay was inhibited by Cdx2 as well as miniCdx2 (Figure 4C) which both interacted with Ku70/80 (Figure 2B). Inversely, the truncated Cdx2[1–220] mutant, that failed to interact with Ku70/80, did not inhibit DNA repair, demonstrating that the physical interaction between Cdx2 and the Ku70/80 complex is required for Cdx2 to exert its inhibitory effect of C-NHEJ activity.

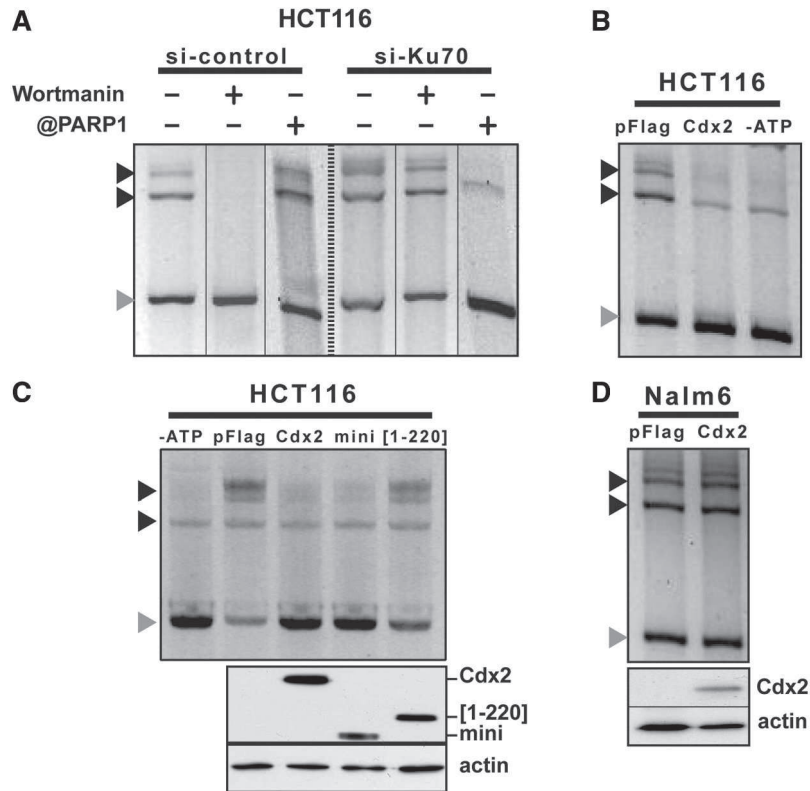
Having demonstrated on the one hand that Cdx2 interacts with Ku70/80 in intestinal cells to inhibit the

Ku70/80-dependent DNA repair activity via the C-NHEJ pathway, and on the other hand that, unlike colon cancer cells, Cdx2 does not interact with Ku70/80 in leukemia cells, we checked whether Cdx2 has any effect on the DNA repair activity measured in blood cells using the *in vitro* assay. To this end, linear DNA was incubated with nuclear extracts of Nalm6 cells transfected with the Cdx2 expressing or with the control pFlag2 plasmids and the resulting DNA fragments were analyzed by gel electrophoresis. The Figure 4D shows that Cdx2 failed to inhibit DNA repair activity in leukemia cells, despite its high level of expression, which clearly contrasted with the results obtained in colon cancer cells.

#### Cdx2 inhibits *in vivo* DNA repair in intestinal cell lines

Next, we analyzed DNA repair *in vivo*, using the model developed by Wang *et al.* (29). This reporter system is based on the plasmid pEGFP-Pem1-Ad2, consisting in the GFP-encoding cDNA sequence interrupted by an intron containing itself an adenovirus exon flanked by two HindIII restriction sites (Figure 5A). When this plasmid is cut with HindIII and transfected into cells, it presents cohesive ends mimicking DSBs, which are then processed by the NHEJ machinery to circularize the plasmid and subsequently allow the expression of the reporter GFP after splicing of the intron.

To evaluate DNA repair activity *in vivo*, intestinal cells were cotransfected with the HindIII-linearized plasmid



**Figure 4.** Cdx2 inhibits *in vitro* DNA repair in intestinal cells but not in leukemia cells. (A) NHEJ-C predominates in HCT116 cells. Linear DNA was incubated with nuclear extracts of HCT116 cells transfected with the siRNA against Ku70 or control siRNA. Processed plasmids were separated from the linear DNA by gel electrophoresis. When indicated, wortmanin or anti-PARP-1 antibodies were added to the reaction. (B) Cdx2 inhibits *in vitro* DNA repair in HCT116 cells. HCT116 cells were transfected with empty vector or pFlag-Cdx2 plasmids and nuclear extracts were assayed for *in vitro* DNA repair. When indicated (-ATP), ATP was omitted in the reaction. (C) Cdx2[1–220] mutant does not inhibit DNA repair. HCT116 cells were transfected with empty vector or Cdx2 mutant plasmids as indicated and nuclear extracts were assayed for *in vitro* DNA repair. When indicated (-ATP), ATP was omitted in the reaction. Above, expression of Cdx2 and its mutants was checked by western blot on 10  $\mu$ g of whole-protein extracts using anti-Flag antibody. Actin was used as loading control. (D) Cdx2 does not alter *in vitro* DNA repair in Nalm6 cells. Nalm6 cells were transfected with empty vector or pFlag-Cdx2 plasmids and nuclear extracts were assayed for *in vitro* DNA repair. Gray arrows indicate linear plasmid and black arrows multimeric forms of the plasmid.

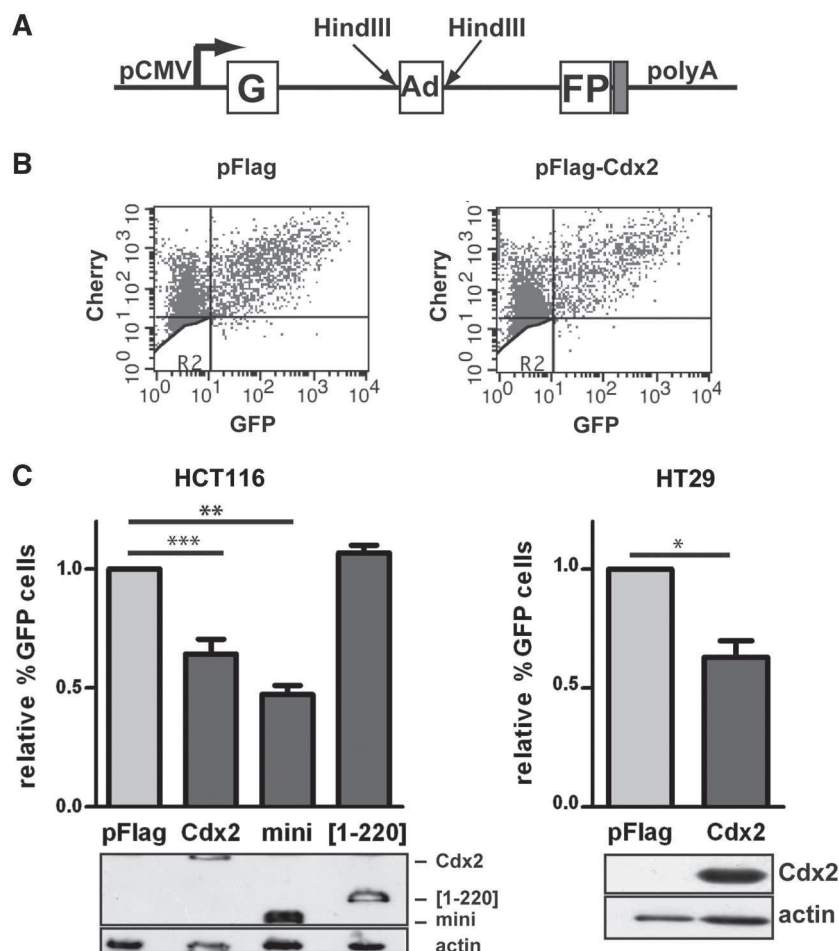
pEGFP-Pem1-Ad2 and the plasmid encoding the red fluorescent protein Cherry to normalize the results. The number of GFP and Cherry positive cells were quantified by FACS 72 h after transfection and an example of the green-versus-red fluorescent plot is illustrated on Figure 5B. When HCT116 cells were cotransfected with the Cdx2-encoding plasmid, the number of GFP-positive cells was significantly reduced when compared with cells cotransfected with the control vector pFlag2, indicating that the presence of Cdx2 alters the activity of DSB repair *in vivo* (Figure 5C, left panel). This result was confirmed in HT29 cells (Figure 5C, right panel). Moreover, miniCdx2, shown above to interact with Ku70/80 like Cdx2, had the same inhibitory effect as Cdx2, whereas the truncated form Cdx2[1–220] that lacks the ability to interact with Ku70/80 proteins, failed to inhibit DNA repair activity *in vivo* (Figure 5C, left panel).

#### Neither Ku proteins and DNA-PKcs recruitment nor DNA-PKcs autophosphorylation are affected by Cdx2, but Cdx2 inhibits DNA-PK activity

DNA repair by the C-NHEJ machinery involves sequential steps of recruitment and activation of several proteins.

The first one consists in the recruitment of Ku70/80 heterodimers on the DNA breaks. Because Cdx2 interacts with Ku70/80 and inhibits DNA repair, we wondered whether this interaction perturbed Ku70/80 recruitment on the broken DNA ends. To address this issue, we used an ELISA method to quantify the amount of Ku70 protein bound on immobilized linear double-strand DNA molecules mimicking broken DNA ends. Nuclear extracts were prepared from HCT116 cells transfected with the Cdx2 encoding or pFlag2 control plasmid and incubated with the immobilized DNA molecules. As illustrated in Figure 6A, the presence of Cdx2 did not change the ability of Ku70 to bind DNA ends, suggesting that Cdx2 does not alter the recruitment of Ku proteins onto broken DNA.

Once Ku70/80 proteins have recognized the broken DNA ends, DNA-PK is recruited into the repair complex and activated by autophosphorylation (31,32). Therefore, we followed the recruitment of DNA-PKcs by coimmunoprecipitation with Ku70 antibody in the presence or absence of Cdx2. As illustrated on Figure 6B, the presence of Cdx2 in HCT116 cells transfected with the Cdx2-encoding plasmid did not change the level



**Figure 5.** Cdx2 inhibits DNA repair *in vivo* in intestinal cells. (A) Schematic representation of the pEGFP-Pem1-Ad2 plasmid. G and FP corresponds to the 5' and 3' part of the GFP encoding cDNA. Ad corresponds to the adenoviral intron flanked by two HindIII sites. pCMV indicates the CMV promoter. (B) Example of green-versus-red fluorescent plots. The experiment was performed in HCT116 transfected with pFlag (left panel) or pFlag-Cdx2 (right panel). X axis: green fluorescence; Y axis: red fluorescence. (C) Cdx2 alters the *in vivo* DNA repair. Results represent the mean of at least four experiments performed in HCT116 (left panel) or HT29 (right panel) transfected with either pFlag, pFlag-Cdx2, pFlag-miniCdx2 or Cdx2[1-220] plasmids as indicated. The percentage of GFP and Cherry double positive cells in the Cherry positive cell population was set at 1 for pFlag and error bars represent SEM. Asterisk indicate a significant difference (\*\* $P < 0.01$ ; \* $P < 0.05$ ). Above, expression of Cdx2 and its mutants was checked by western blot on 10  $\mu$ g of whole protein extracts using anti-Flag antibody. Actin was used as loading control.

of DNA-PKcs coimmunoprecipitated with Ku70 antibody, as compared to cells transfected with the control plasmid pFlag2. As expected, adding ethidium bromide (EtBr) in the protein extracts disrupted Ku70/DNA-PKcs interaction; EtBr also compromised Ku70/Cdx2 interaction, suggesting that it is DNA dependant (Figure 6B).

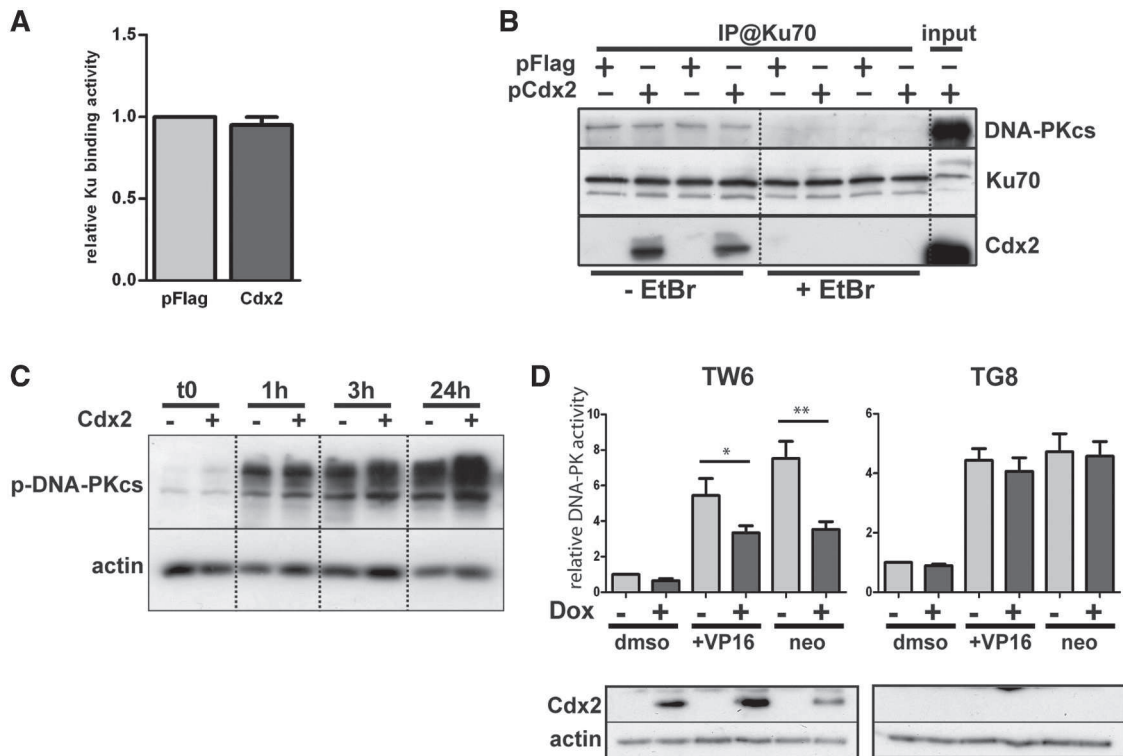
We then explored the capacity of the DNA-PKcs to autophosphorylate. We compared the Thr2609 phosphorylation of DNA-PKcs after etoposide (VP16) treatment of HCT116 cells transfected with the Cdx2 encoding or control pFlag2 plasmids. As expected, DSBs induced by etoposide rapidly enhanced Thr2609 phosphorylation of DNA-PK which persisted over 24 h; the presence of Cdx2 did neither significantly modify the level nor the time-course of phosphorylation (Figure 6C).

DNA-PK phosphorylates several intracellular proteins, including proteins of the NHEJ pathway as Artemis, Ku70 and Ku80, H2AX and numerous nuclear DNA-binding proteins such as tumor suppressor protein p53

(33). We investigated the phosphorylating activity of DNA-PKcs in an assay based on *in vitro* solid phase sandwich ELISA that captures total endogenous p53 protein and detects the level of p53 phosphorylated on Ser15. Inducible HT29-TW6 and HT29-TG8 cell lines producing either Cdx2 or GFP as control upon induction with doxycyclin (15) were either uninduced or treated with doxycyclin and then treated for one hour with etoposide or neocarzinostatin to induce DSB or with the vehicle as control. Nuclear extracts were prepared and tested for their DNA-PK phosphorylation activity. As presented on Figure 6D, the level of phosphorylation of the DNA-PKcs target was significantly reduced when Cdx2 expression was induced by doxycyclin, suggesting that Cdx2 inhibits the DNA-PK phosphorylation activity.

#### Cdx2 inhibits cells survival after etoposide treatment in colon cancer cells but not in leukemia cells

Alteration of DSB repair compromises cell survival following a genotoxic stress, since the accumulation of

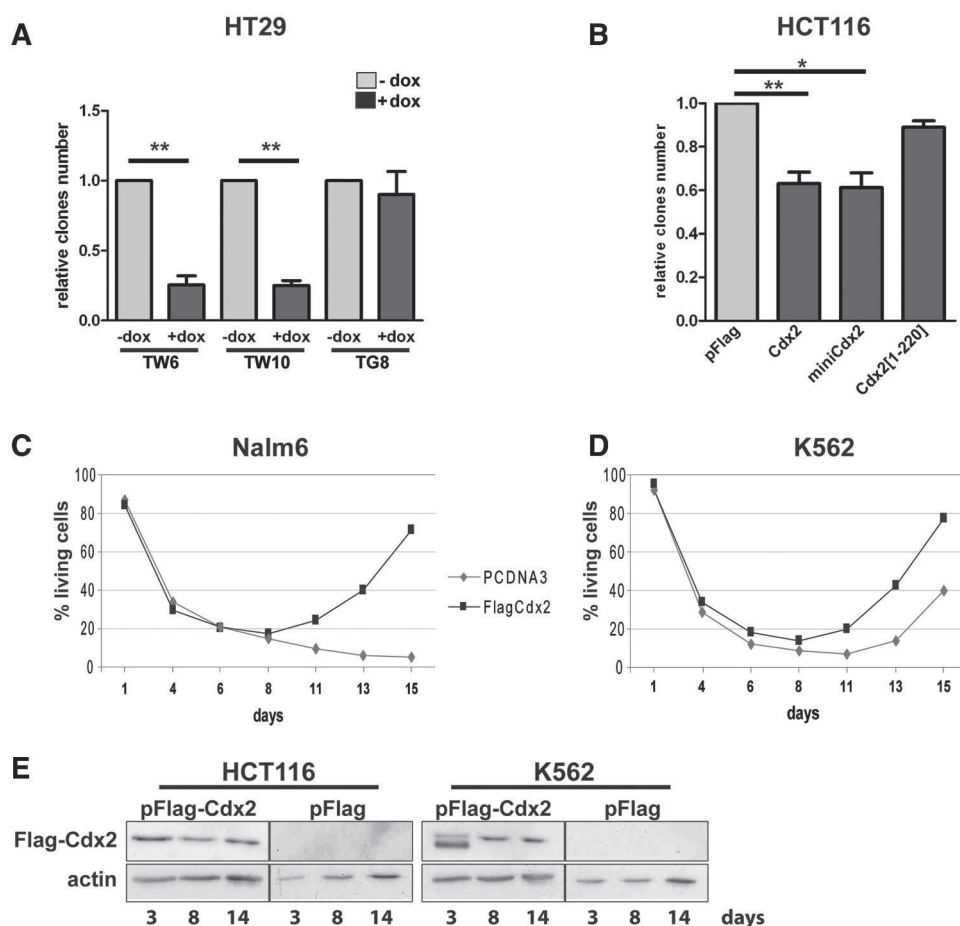


**Figure 6.** Cdx2 does alter neither Ku proteins and DNA-PKcs recruitment nor DNA-PK autophosphorylation but inhibits DNA-PKcs activity. (A) Cdx2 does not interfere with DSB Ku70 binding. HCT116 cells were transfected with pFlag (light gray) or Cdx2 (dark gray) expressing plasmid and Ku70 binding activity was assessed. Results represent the mean of at least four independent experiments. pFlag values were set at 1. (B) Cdx2 does not alter DNA-PKcs recruitment. HCT116 were transfected with either pFlag or pFlag-Cdx2 as indicated and immunoprecipitation was performed using anti-Ku70 antibodies in the presence or absence of Ethidium Bromide (EtBr) as indicated at the bottom of the figure. DNA-PKcs, Ku70 or Cdx2 were revealed by western blot. Twenty micrograms of whole-protein extract were loaded on the right line (input). (C) Cdx2 does not modify DNA-PKcs autophosphorylation. Time course analysis of the phosphorylation of the DNA-PKcs after etoposide treatment 100  $\mu$ M for 1 hour of HCT116 cells transfected with pFlag or pFlag-Cdx2. Phospho-DNA-PKcs was revealed by western blot.  $\beta$ -actin was used to normalized the amount of loaded proteins. (D) Cdx2 inhibits DNA-PKcs activity. DNA-PKcs activity was assessed in HT29-TW6 or -TG8 (control) cells treated or not with etoposide (VP16) 100  $\mu$ M or neocarzinostatin 200 ng/ $\mu$ L for 1 hour. Cdx2 expression was induced with doxycyclin when indicated (dark gray bars). Experiments without doxycyclin and etoposide treatment were considered as references and results were set at 1. Results illustrate the mean of at least six experiments and error bars represent SEM. Asterisk indicates a significant difference (\*\* $P < 0.01$ ; \* $P < 0.05$ ). Above, Cdx2 expression was checked by western blot using anti-Cdx2 antibody on 10  $\mu$ g of whole-protein extracts. Actin was used as loading control.

broken DNA ends induces apoptosis (34). Because Cdx2 inhibits DNA repair in colon cancer cells but not in leukemia cells, we tested the consequence of its expression on cell survival after a genotoxic stress in both types of cells. For this purpose, we used on the one hand the human colon cancer cell lines HT29-TW6 and -TW10 in which Cdx2 expression can be switched on by Doxycyclin (15), and on the other hand, HCT116 cells transiently transfected with the Cdx2-encoding plasmid. Cells were treated for 24 h with the topoisomerase II inhibitor etoposide so as to induce DSBs and allowed to recover for 2 weeks. Cdx2 expression was followed by western blot and was confirmed even at 14-days post-transfection (Figure 7E, left panel). Cell survival was quantified by measuring the number of remaining colonies. As illustrated in Figure 7A, the induction of Cdx2 expression by Doxycyclin strongly reduced cell survival in the HT29-TW6 and -TW10 lines as compared to cells treated with the vehicle, whereas the survival of the control line HT29-TG8 expressing GFP instead of Cdx2 was unchanged upon Doxycyclin treatment. Similarly, the

transient expression of Cdx2 reduced the survival of etoposide-treated HCT116 cells (Figure 7B). The effect was less pronounced in HCT116 than in HT29 cells likely because the efficacy of Cdx2 expression was lower by transient cell transfection than in stable cell lines homogeneously treated with Doxycyclin. MiniCdx2, which interacts with Ku70/80 too but lacks the transactivating domain, also compromised HCT116 cell survival after etoposide treatment, thus indicating that this effect is not dependent on the transcriptional activity of Cdx2. Moreover, the truncated mutant Cdx2[1–220] that does not interact with Ku proteins, failed to reduce cell survival, in contrast to Cdx2 and miniCdx2.

Next, these experiments were repeated in leukemia cells instead of colon cancer cells and cell apoptosis was followed by FACS after AnnexinV labeling. Results present the percentage of living cells. In both K562 and Nalm6 cell lines, etoposide induced a strong decline of living cells during the first week, whether transfected with the pFlag2 control vector or with the Cdx2-encoding plasmid (Figure 7C and D). Protein expression



**Figure 7.** Cdx2 inhibits cell survival in intestinal cells but rather enhances cell recovery in leukemia cells. (A) Cdx2 inhibits cell survival in HT29 cells. HT29-TW6, -TW10 or -TG8 were treated with etoposide in the presence (dark gray) or not (light gray) of doxycyclin and cultured for 2 weeks. (B) Cdx2 inhibits cell survival in HCT116 cells. HCT116 cells were transfected with either pFlag, pFlag-Cdx2, pFlag-miniCdx2 or pFlag-Cdx2[1-220] plasmids as indicated, treated with etoposide and cultured for 2 weeks. For A and B, the numbers of clones are represented as the mean of four independent experiments. Values corresponding to -dox for HT29 or pFlag for HCT116 were set at 1 and error bars represent SEM. Asterisks indicate a significant difference (\*\* $P < 0.01$ ; \* $P < 0.05$ ). (C) and (D) Cdx2 does not alter cell survival in leukemia cells. Nalm6 or K562 cells were transfected with vehicle or pFlag-Cdx2 and cell death number was quantified using annexinV-FITC/propidium iodide at different times after etoposide treatment as indicated. Results are represented as percentage of living cells. For C and D, results of a representative experiment performed in triplicates are shown. (E) Control of Cdx2 protein expression. At 3, 8, or 14 days after transfection with indicated plasmids, HCT116 or K562 cells were lysed in laemmli buffer and Cdx2 expression was tested by western blot on 10  $\mu$ g of whole protein extracts using anti-Flag antibody. Actin was used as loading control.

in K562 was confirmed by western blot at 14 days after transfection (Figure 7E, right panel). Interestingly, from 1 week after treatment onwards, cells transfected with Cdx2 entered again a growing phase, in contrast to the cells transfected with the control plasmid. These results indicate that, unlike colon cancer cells, Cdx2 does not compromise cell survival after genotoxic stress in leukemia cells, and that it even facilitates cell recovery and/or growth at long term. Hence the effect of Cdx2 on the response to a genotoxic stress is different in colon cancer cells compared to leukemia cells.

## DISCUSSION

The homeoprotein Cdx2 is recognized as a classical transcription factor that acts via DNA binding to a consensus AT-rich sequence and activation of transcription by the

transactivation domain (7,35,36). In the present study, we uncovered a new role for Cdx2 in regulating DNA repair and we provide evidence that this function does not require its transactivation domain. This new role depends on the interaction of Cdx2 with the Ku70/80 proteins and subsequently the inhibition of the NHEJ DNA repair machinery, independently of the transcriptional activity of Cdx2. Moreover, this new function is cell type specific since it is active in intestinal cells where the gene is normally expressed, but inactive in leukemia cells where Cdx2 becomes ectopically turned on only during the transformation process of hematopoietic cells. This differential function in intestinal and leukemia cells is correlated to the cell specific ability of Cdx2 to interact with Ku70/80. The reason why Cdx2 is unable to interact with Ku70/80 in leukemia cells remains to be elucidated. One possibility is that Cdx2 and/or Ku70/80 undergo different post-translational modifications that differentially

control their interaction in intestinal compared to leukemia cells. Another possibility is that the interaction between Cdx2 and Ku70/80 is indirect and depends on an intermediary factor present in intestinal but not in leukemia cells.

The binding of Ku70/80 to broken DNA ends is the first step that initiates DNA repair by the conventional C-NHEJ machinery. In the presence of Cdx2, neither the binding of Ku70/80 to the DNA nor the recruitment of DNA-PKcs is altered despite the interaction of Cdx2 with the Ku70/80-DNA-PKcs complex; however, the kinase activity of the DNA-PK, a major component of C-NHEJ recruited by Ku70/80, is reduced. This ultimately results in a decreased DNA repair demonstrated here using *in vivo* and *in vitro* assays. Because Cdx2 does not compromise DNA recognition by Ku70/80, the Ku70/80 occupancy of the broken DNA ends prevents the recruitment of PARP-1 and thus the activation of the alternative A-NHEJ pathway normally activated in case of the low activity of C-NHEJ. Therefore, in the presence of Cdx2, the reduced activity of C-NHEJ is not compensated by A-NHEJ.

An increasing number of studies documents new functions for homeoproteins besides their primary role of transcription factors. Especially, several classical or distantly-related homeodomain-containing proteins interact with Ku proteins, such as HoxC4, HoxD4, Oct-1, Oct-2 or Dlx2, and are phosphorylated by the DNA-PK. Yet, the functional significance of this interaction remains elusive (25,37). The case of the homeoprotein HoxB7, which is also a partner of Ku70/80 (24), is of particular interest regarding the results we have obtained for Cdx2. Indeed, HoxB7 elicits a transformed phenotype in mammary cancer cells, increases the cell resistance to a genotoxic stress, and interacts with the Ku70/80-dependent NHEJ machinery to stimulate DNA repair activity (24); this signifies that the stimulation of DNA repair by NHEJ is linked to tumor progression, likely because of the genetic alterations caused by this error-prone DNA repair pathway. Inversely, the interaction of Cdx2 with Ku70/80 in intestinal cells inhibits the NHEJ DNA repair activity and hampers cell recovery after a genotoxic stress, associated to a tumor suppressor function of Cdx2 in the gut. Despite their opposite effect on NHEJ activity, HoxB7 and Cdx2 both interact with Ku70/80 through the third  $\alpha$ -helix of the homeodomain. Further studies will allow determining the mechanisms by which the homeodomains of HoxB7 and Cdx2 act, respectively, to stimulate or inhibit the NHEJ activity. This study supports the hypothesis that the opposite effects reported for Cdx2 in colon cancers and leukemia, respectively, as tumor suppressor and oncogene, relies at least in part on the fact that this homeoprotein interacts with a different set of partners depending on the cellular context. Indeed, in leukemia cells the ectopically expressed Cdx2 protein is not able to interact with Ku proteins and to inhibit the activity of the error-prone pro-oncogenic NHEJ pathway, whereas in colon cancer cells the interaction of Cdx2 with the NHEJ machinery reduces the DNA repair activity. In the normal gut, Cdx2 is expressed in most of the epithelial cells including the stem cells and transit amplifying cells.

On the basis of the results shown here, we propose that in this rapidly renewing system, there is a benefit to prevent DNA repair by NHEJ because of the risk of fixing oncogenic mutations, whereas when cells keep the DNA breaks unrepaired, they are eliminated by gatekeeper pathways. Indeed, several lines of evidence suggest that aberrant repair of DSBs by error-prone NHEJ could contribute to the accumulation of genomic alterations, as in the case of Bloom syndrome for example, and lead to chromosomal instability and cancer (38). This is corroborated by our finding that a decreased expression of Cdx2 in Cdx2<sup>+/-</sup> heterozygote mice lessens apoptosis in the colon epithelium after  $\gamma$ -irradiation (14), thus rendering the gut epithelium more resistant to a genotoxic stress. This is also consistent with the fact that Cdx2 overexpression, together with Cdx1, in human colon cancer cells leads to reduced malignancy associated with higher sensitivity to apoptosis (39). Therefore, the effect of Cdx2 on the NHEJ DNA repair activity may contribute to the tumor suppressor function attributed to this gene in the gut.

## SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary Data are available at NAR Online: Supplementary Figure 1.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Dr Iliakis for providing the plasmid pEGFP-Pem1-Ad2, Dr van den Broek for FOXO4 and Ku protein expression plasmids and 6DBE-luc construct, Dr Hendrickson for technical advises and H. Domon and M. Maarouf for comments on the manuscript. B.R., C.D.D. and J.N.F. designed the experiments; B.R., C.S., M.V., F.D., E.M., T.S. and C.D.D. performed the experiments; B.R., C.D.D., I.D., I.G. and J.N.F. analyzed the data; I.G. provided essential reagents; C.D.D. and J.N.F. provided funding; C.D.D. and J.N.F. wrote the article.

## FUNDING

Institut National du Cancer (INCa, ACM 07), the Ligue du Haut-Rhin contre le Cancer and the Canceropôle Grand-Est. B.R. was funded by the INCa (ACM 07), and C.S. by the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. Funding for open access charge: INSERM academic institution.

*Conflict of interest statement.* None declared.

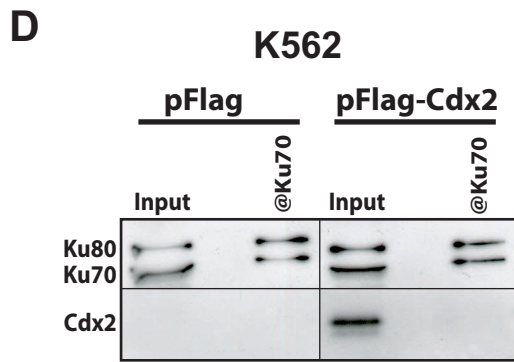
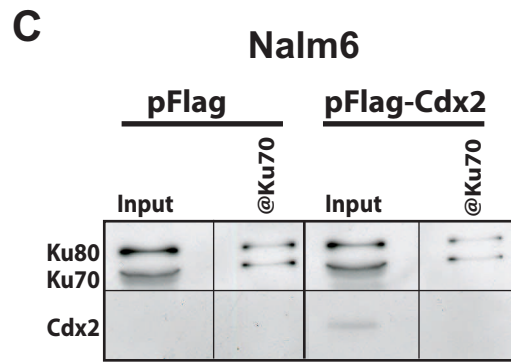
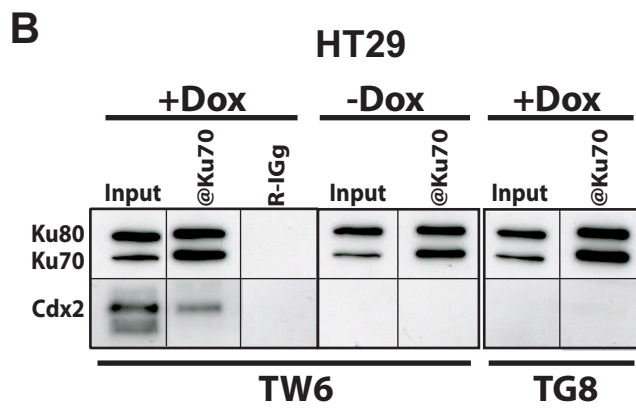
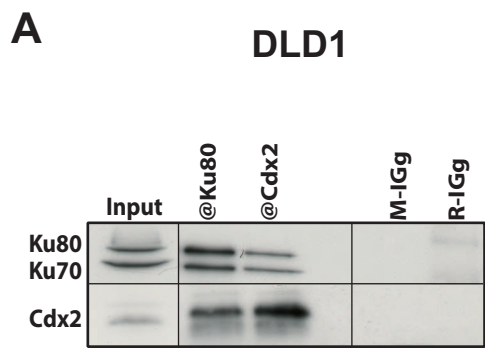
## REFERENCES

1. Chawengsaksophak, K., James, R., Hammond, V.E., Kontgen, F. and Beck, F. (1997) Homeosis and intestinal tumours in Cdx2 mutant mice. *Nature*, **386**, 84–87.
2. Chawengsaksophak, K., De Graaff, W., Rossant, J., Deschamps, J. and Beck, F. (2004) Cdx2 is essential for axial elongation in mouse development. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **101**, 7641–7645.
3. Van Den Akker, E., Forlani, S., Chawengsaksophak, K., De Graaff, W., Beck, F., Meyer, B.I. and Deschamps, J. (2002) Cdx1 and Cdx2 have overlapping functions in anteroposterior

- patterning and posterior axis elongation. *Development*, **129**, 2181–2193.
4. Beck,F., Chawengsaksophak,K., Waring,P., Playford,R.J. and Furness,J.B. (1999) Reprogramming of intestinal differentiation and intercalary regeneration in Cdx2 mutant mice. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **96**, 7318–7323.
  5. Gao,N., White,P. and Kaestner,K.H. (2009) Establishment of intestinal identity and epithelial-mesenchymal signaling by Cdx2. *Dev. Cell*, **16**, 588–599.
  6. Crissey,M.A., Guo,R., Funakoshi,S., Kong,J., Liu,J. and Lynch,J.P. (2011) Cdx2 levels modulate intestinal epithelium maturity and paneth cell development. *Gastroenterology*, **140**, 517–528.
  7. Verzi,M.P., Shin,H., He,H.H., Sulahian,R., Meyer,C.A., Montgomery,R.K., Fleet,J.C., Brown,M., Liu,X.S. and Shivdasani,R.A. (2010) Differentiation-specific histone modifications reveal dynamic chromatin interactions and partners for the intestinal transcription factor CDX2. *Dev. Cell*, **19**, 713–726.
  8. Calon,A., Gross,I., Lhermitte,B., Martin,E., Beck,F., Duclos,B., Kedinger,M., Duluc,I., Domon-Dell,C. and Freund,J.N. (2007) Different effects of the Cdx1 and Cdx2 homeobox genes in a murine model of intestinal inflammation. *Gut*, **56**, 1688–1695.
  9. Kim,S.P., Park,J.W., Lee,S.H., Lim,J.H., Jang,B.C., Lee,S.H., Jang,I.H., Freund,J.N., Suh,S.I., Mun,K.C. *et al.* (2004) Homeodomain protein CDX2 regulates COX-2 expression in colorectal cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **315**, 93–99.
  10. Mutoh,H., Hayakawa,H., Sakamoto,H. and Sugano,K. (2007) Homeobox protein CDX2 reduces Cox-2 transcription by inactivating the DNA-binding capacity of nuclear factor- $\kappa$ B. *J. Gastroenterol.*, **42**, 719–729.
  11. Guo,R.J., Funakoshi,S., Lee,H.H., Kong,J. and Lynch,J.P. (2010) The intestine-specific transcription factor Cdx2 inhibits beta-catenin/TCF transcriptional activity by disrupting the beta-catenin-TCF protein complex. *Carcinogenesis*, **31**, 159–166.
  12. Aoki,K., Kakizaki,F., Sakashita,H., Manabe,T., Aoki,M. and Taketo,M.M. (2011) Suppression of colonic polyposis by homeoprotein CDX2 through its nontranscriptional function that stabilizes p27Kip1. *Cancer Res.*, **71**, 593–602.
  13. Aoki,K., Tamai,Y., Horiike,S., Oshima,M. and Taketo,M.M. (2003) Colonic polyposis caused by Mtor-mediated chromosomal instability in Apc+/ $\Delta$ 716 Cdx2+/- compound mutant mice. *Nat. Genet.*, **35**, 323–330.
  14. Bonhomme,C., Duluc,I., Martin,E., Chawengsaksophak,K., Chenard,M.P., Kedinger,M., Beck,F., Freund,J.N. and Domon-Dell,C. (2003) The Cdx2 homeobox gene has a tumour suppressor function in the distal colon in addition to a homeotic role during gut development. *Gut*, **52**, 1465–1471.
  15. Gross,I., Duluc,I., Benameur,T., Calon,A., Martin,E., Brabletz,T., Kedinger,M., Domon-Dell,C. and Freund,J.N. (2008) The intestine-specific homeobox gene Cdx2 decreases mobility and antagonizes dissemination of colon cancer cells. *Oncogene*, **27**, 107–115.
  16. Scholl,C., Bansal,D., Dohner,K., Eiwien,K., Huntly,B.J., Lee,B.H., Rucker,F.G., Schlenk,R.F., Bullinger,L., Dohner,H. *et al.* (2007) The homeobox gene CDX2 is aberrantly expressed in most cases of acute myeloid leukemia and promotes leukemogenesis. *J. Clin. Invest.*, **117**, 1037–1048.
  17. Thoene,S., Rawat,V.P., Heilmeier,B., Hoster,E., Metzler,K.H., Herold,T., Hiddemann,W., Gokbuget,N., Hoelzer,D., Bohlander,S.K. *et al.* (2009) The homeobox gene CDX2 is aberrantly expressed and associated with an inferior prognosis in patients with acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, **23**, 649–655.
  18. Rothkamm,K. and Lobrich,M. (2002) Misrepair of radiation-induced DNA double-strand breaks and its relevance for tumorigenesis and cancer treatment (Review). *Int J Oncol.*, **21**, 433–440.
  19. Delacote,F. and Lopez,B.S. (2008) Importance of the cell cycle phase for the choice of the appropriate DSB repair pathway, for genome stability maintenance: the trans-S double-strand break repair model. *Cell Cycle*, **7**, 33–38.
  20. Downs,J.A. and Jackson,S.P. (2004) A means to a DNA end: the many roles of Ku. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **5**, 367–378.
  21. Lieber,M.R., Ma,Y., Pannicke,U. and Schwarz,K. (2008) The mechanism of vertebrate nonhomologous DNA end joining and its role in V(D)J recombination. *DNA Repair*, **3**, 817–826.
  22. Van Gent,D.C. and Van Der Burg,M. (2007) Non-homologous end-joining, a sticky affair. *Oncogene*, **26**, 7731–7740.
  23. Soderberg,O., Leuchowius,K.J., Gullberg,M., Jarvius,M., Weibrecht,I., Larsson,L.G. and Landegren,U. (2008) Characterizing proteins and their interactions in cells and tissues using the in situ proximity ligation assay. *Methods*, **45**, 227–232.
  24. Rubin,E., Wu,X., Zhu,T., Cheung,J.C., Chen,H., Lorincz,A., Pandita,R.K., Sharma,G.G., Ha,H.C., Gasson,J. *et al.* (2007) A role for the HOXB7 homeodomain protein in DNA repair. *Cancer Res.*, **67**, 1527–1535.
  25. Schild-Poulter,C., Pope,L., Giffin,W., Kochan,J.C., Ngsee,J.K., Traykova-Andonova,M. and Haché,R.J.G. (2001) The binding of Ku antigen to homeodomain proteins promotes their phosphorylation by DNA-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.*, **276**, 16848–16856.
  26. Modica,S., Morgano,A., Salvatore,L., Petruzzelli,M., Vanier,M.T., Valanzano,R., Esposito,D.L., Palasciano,G., Duluc,I., Freund,J.N. *et al.* (2009) Expression and localisation of insulin receptor substrate 2 in normal intestine and colorectal tumours. Regulation by intestine-specific transcription factor CDX2. *Gut*, **58**, 1250–1259.
  27. Brenkman,A.B., van den Broek,N.J.F., de Keizer,P.L.J., van gent,D.C. and Burgering,B.M.T. (2010) The DNA damage repair protein Ku70 interacts with FOXO4 to coordinate a conserved cellular stress response. *FASEB J.*, **24**, 4271–4280.
  28. Fattah,F., Lee,E.H., Weisensel,N., Wang,Y., Lichter,N. and Hendrickson,E.A. (2010) Ku regulates the non-homologous end joining pathway choice of DNA double-strand break repair in human somatic cells. *Plos Genet.*, **6**, E1000855.
  29. Wang,M., Wu,W., Wu,W., Rosidi,B., Zhang,L., Wang,H. and Iliakis,G. (2006) PARP-1 And Ku compete for repair of DNA double strand breaks by distinct NHEJ pathways. *Nucleic Acids Res.*, **34**, 6170–6182.
  30. Iliakis,G., Rosidi,B., Wang,M. and Wang,H. (2006) Plasmid-based assays for DNA end-joining in vitro. *Methods Mol. Biol.*, **314**, 123–131.
  31. Lieber,M.R. (2008) The mechanism of human nonhomologous DNA end joining. *J. Biol. Chem.*, **283**, 1–5.
  32. Lieber,M.R., Lu,H., Gu,J. and Schwarz,K. (2008) Flexibility in the order of action and in the enzymology of the nuclease, polymerases, and ligase of vertebrate non-homologous DNA end joining: relevance to cancer, aging, and the immune system. *Cell Res.*, **18**, 125–133.
  33. Collis,S.J., Deweese,T.L., Jeggo,P.A. and Parker,A.R. (2004) The life and death of DNA-PK. *Oncogene*, **24**, 949–961.
  34. Roos,W.P. and Kaina,B. (2006) DNA damage-induced cell death by apoptosis. *Trends Mol. Med.*, **12**, 440–450.
  35. Rings,E.H., Boudreau,F., Taylor,J.K., Moffett,J., Suh,E.R. and Traber,P.G. (2001) Phosphorylation of the Serine 60 residue within the Cdx2 activation domain mediates its transactivation capacity. *Gastroenterology*, **121**, 1437–1450.
  36. Verzi,M.P., Hatzis,P., Sulahian,R., Philips,J., Schuijers,J., Shin,H., Freed,E., Lynch,J.P., Dang,D.T., Brown,M. *et al.* (2010) TCF4 and CDX2, major transcription factors for intestinal function, converge on the same Cis-regulatory regions. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **107**, 15157–15162.
  37. Schild-Poulter,C., Shih,A., Tantin,D., Yarymowich,N.C., Soubeyrand,S., Sharp,P.A. and Hache,R.J.G. (2007) DNA-PK phosphorylation sites on Oct-1 promote cell survival following DNA damage. *Oncogene*, **26**, 3980–3988.
  38. Gaymes,T.J., North,P.S., Brady,N., Hickson,I.D., Mufti,G.J. and Rassool,F.V. (2002) Increased error-prone non homologous DNA end-joining—a proposed mechanism of chromosomal instability in Bloom's syndrome. *Oncogene*, **21**, 2525–2533.
  39. Mallo,G.V., Soubeyran,P., Lissitzky,J.C., Andre,F., Farnarier,C., Marvaldi,J., Dagorn,J.C. and Iovanna,J.L. (1998) Expression of the Cdx1 and Cdx2 homeotic genes leads to reduced malignancy in colon cancer-derived cells. *J. Biol. Chem.*, **273**, 14030–14036.

40. Brattain,M.G., Fine,W.D., Khaled,F.M., Thompson,J. and Brattain,D.E. (1981) Heterogeneity of malignant cells from a human colonic carcinoma. *Cancer Res.*, **41**, 1751–1756.
41. Leibovitz,A., Stinson,J.C., Mccombs,W.B., Mccoy,C.E., Mazur,K.C. and Mabry,N.D. (1976) Classification of human colorectal adenocarcinoma cell lines. *Cancer Res.*, **36**, 4562–4569.
42. Lozzio,C.B. and Lozzio,B.B. (1975) Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive philadelphia chromosome. *Blood*, **45**, 321–334.
43. Han,T., Dadey,B. and Minowada,J. (1978) Unique leukemic non-T/Non-B lymphoid cell lines (REH And KM-3): absence of MLR-S and presence of suppressor cell activity for normal T-cell response. *J. Clin. Lab. Immunol.*, **1**, 237–243.
44. Delalande,F., Carapito,C., Brizard,J.P., Brugidou,C. and Van Dorselaer,A. (2005) Multigenic families and proteomics: extended protein characterization as a tool for paralog gene identification. *Proteomics*, **5**, 450–460.
45. Pastwa,E., Neumann,R.D. and Winters,T.A. (2001) In vitro repair of complex unligatable oxidatively induced DNA double-strand breaks by human cell extracts. *Nucleic Acids Res.*, **29**, E78.





Supplementary Figure 1

**Supplementary Figure 1. Co-immunoprecipitation of Cdx2 and Ku protein in different intestinal or leukemic cell lines.** (A) Endogenous Cdx2 and Ku proteins co-immunoprecipitate in DLD1 cells. Co-IP were performed using rabbit anti-Ku80 or mouse anti-Cdx2 antibodies. Western blot were revealed using anti-Ku antibodies (upper panel) or anti-Cdx2 antibody (lower panel). Rabbit or mouse IgG were used as control. (B) Cdx2 and Ku proteins co-immunoprecipitate in HT29 cells. When indicated (+/- Dox), Cdx2 or GFP expression was induced by Doxycycline treatment of TW6 cells or TG8 control cells respectively, and co-immunoprecipitation were performed using rabbit anti-Ku70 antibody. Western blot were revealed using anti-Ku antibodies (upper panel) or anti-Cdx2 antibody (lower panel). Rabbit IgG were used as negative controls. (C) and (D) Cdx2 and Ku proteins do not interact in leukemic cells. Nalm6 or K562 were transfected with pFlag or pFlag-Cdx2 expression plasmids and co-immunoprecipitation were performed using rabbit anti-Ku70 antibody. Western blot were revealed using anti-Ku antibodies (upper panel) or anti-Flag antibody (lower panel).

### 3. Conclusion

En conclusion, CDX2 agit de manière différente dans la lignée cancéreuse colique comparée à la lignée hématopoïétique, entre autre, en interagissant avec des partenaires différents selon la lignée et via une nouvelle fonction non-transcriptionnelle.

La découverte de cette nouvelle fonction non-transcriptionnelle de CDX2 dans la réparation de l'ADN démontre, une nouvelle fois, le rôle suppresseur de tumeur de *Cdx2* dans l'épithélium intestinal où il est normalement exprimé.

CDX2 interagit avec le complexe protéique KU70/80. Il en résulte une inhibition de la réparation des cassures double-brins de l'ADN et de la survie cellulaire. La réparation des cassures par le C-NHEJ n'est pas fidèle et peut entraîner la survenue de mutations, réarrangements et délétions chromosomiques qui peuvent être délétères pour la cellule. Du fait que l'épithélium intestinal est un tissu en constant renouvellement avec un cycle rapide (4 à 5 jours chez l'Homme), CDX2, en inhibant la réparation, favorise la mort de la cellule par apoptose plutôt que de réparer l'ADN au risque d'engendrer des mutations potentiellement oncogéniques. Grâce au renouvellement actif de l'épithélium intestinal, cette perte de cellules n'est pas dramatique puisqu'elles seront rapidement remplacées. De ce fait, CDX2 prévient le développement tumoral au niveau du côlon.

Ceci est en accord avec les résultats obtenus précédemment au laboratoire démontrant un rôle de CDX2 dans l'apoptose. En effet, la perte d'un allèle de *Cdx2* entraîne une résistance des cellules à l'apoptose induite chimiquement (Bonhomme et al., 2003). Ces résultats sont également en concordance avec ceux d'Aoki et al. qui montrent que la perte d'un allèle de *Cdx2* augmente le taux de ponts entre les chromosomes en anaphase de même que le nombre d'aberrations chromosomiques démontrant l'implication de *Cdx2* dans le maintien de l'intégrité du génome (Aoki et al., 2003).

A l'inverse, une stimulation de la réparation NHEJ, telle qu'exercée par HOXB7, engendre une résistance des cellules aux agents génotoxiques et favorise le développement tumoral (Rubin et al., 2007). L'effet inhibiteur de CDX2 sur la réparation des cassures de l'ADN participe donc à son rôle de suppresseur de tumeur au niveau du côlon.

## Chapitre II : Les gènes homéotiques et le C-NHEJ

**Soret, C., Martin, E., Vanier, M., Duluc, I., Gross, I., Domon-Dell, C., and Freund, J.-N.** Opposite functions of the CDX2 and HOXB7 homeoproteins on double-strand break DNA repair in colon cancer cells. Manuscrit en cours de rédaction.

### 1. *Hoxb7*, un autre gène homéotique impliqué dans le C-NHEJ

Nous avons mis en évidence un rôle de CDX2 dans le C-NHEJ par son interaction avec les protéines KU70/80. De cette interaction en résulte une inhibition de la réparation des cassures double-brins de l'ADN et de la survie cellulaire, corroborant la fonction suppresseur de tumeur de *Cdx2* dans l'épithélium intestinal.

Cependant, *Cdx2* n'est pas le premier gène homéotique décrit comme ayant un impact sur le mécanisme C-NHEJ. Pem, un facteur de transcription à homéodomaine, stimule la réparation de l'ADN en activant l'expression des gènes de réparation (Wayne et al., 2002). *Hoxb7*, un gène appartenant également à la famille des gènes homéotiques, a été décrit comme un modulateur du C-NHEJ : via une régulation des protéines KU70/80 et DNA-PKcs, HOXB7 stimule le mécanisme NHEJ rendant ainsi les cellules résistantes aux agents endommageant l'ADN (Rubin et al., 2007).

### 2. CDX2 et HOXB7, deux homéoprotéines aux fonctions opposées

Contrairement à CDX2, HOXB7 favorise la réparation des cassures de l'ADN dans les cellules cancéreuses du sein, pouvant potentiellement engendrer des mutations. En agissant sur le même mécanisme, le NHEJ, HOXB7, à l'inverse de CDX2, participe à la dérive oncogénique de la cellule cancéreuse.

HOXB7 et CDX2 sont donc deux protéines appartenant à la même famille des protéines à homéodomaine, interagissant toutes deux avec les protéines KU70/80 via la troisième hélice de leur homéodomaine. Cependant, alors que l'une stimule la réparation, agissant en tant qu'oncogène (HOXB7), l'autre l'inhibe, fonctionnant comme un suppresseur de tumeur (CDX2).

## Comment deux protéines d'une même famille peuvent agir de manière opposée sur un même mécanisme ?

Afin de répondre à cette question, j'ai réalisé une **étude comparative de ces deux protéines dans le modèle du cancer colorectal**. Cette étude permet également de mieux comprendre comment *Cdx2* agit en tant que suppresseur de tumeur.

Les résultats obtenus sont présentés dans un papier en cours de rédaction que je joins à ma thèse et pour lequel je suis premier auteur.

En résumé, nous montrons dans ce papier :

- **Une expression différente de *Cdx2* et *Hoxb7*** : dans l'épithélium intestinal sain, *Cdx2* est exprimé dans l'ensemble des cellules à l'exception des cellules de Paneth alors que *Hoxb7* se situe essentiellement à la base des cryptes. Dans les tumeurs de souris, une baisse globale de l'expression de *Cdx2* s'accompagne d'une augmentation de celle de *Hoxb7*. Dans certaines cellules tumorales, les gènes *Cdx2* et *Hoxb7* sont co-exprimés.
- **Un effet opposés de HOXB7 par rapport à CDX2 sur la réparation de l'ADN dans les cellules cancéreuses coliques** : CDX2 inhibe la réparation alors que HOXB7 la stimule, engendrant réciproquement une baisse de la survie cellulaire après un stress génotoxique lorsque *Cdx2* est surexprimé et une augmentation de la survie lorsque *Hoxb7* est surexprimé.
- **CDX2 et HOXB7 interagissent avec KU70/80** : HOXB7 tout comme CDX2, interagit avec KU70/80 dans la lignée cancéreuse colique via son homéodomaine.
- **CDX2 et HOXB7 n'agissent pas de la même manière sur la réparation** : des mutants de délétion ainsi que des mutants chimériques permettent de mettre en évidence que l'effet stimulateur de HOXB7 sur la réparation de l'ADN nécessite son domaine de transactivation tandis que l'effet inhibiteur exercé par CDX2 ne requiert pas le domaine de transactivation mais nécessite son homéodomaine et la partie C-terminale.
- **L'effet inhibiteur de CDX2 est dominant sur l'effet stimulateur de HOXB7 sur la réparation** : lorsque *Cdx2* et *Hoxb7* sont co-exprimés, une inhibition de la réparation est observée.

- **CDX2 et HOXB7 interagissent ensemble** : des expériences de co-immunoprécipitation montrent que CDX2 et HOXB7 appartiennent à un même complexe et que cette interaction n'est pas dépendante de KU70/80.
- **CDX2 inhibe l'activité transcriptionnelle de HOXB7** : CDX2, de manière dose-dépendante, réduit l'activité transcriptionnelle de HOXB7 en empêchant sa fixation sur la chromatine, démontré par CHIP.

# **Distinct mechanisms for the opposite functions of homeoproteins Cdx2 and HoxB7 in double-strand break DNA repair in colon cancer cells**

**Christine Soret <sup>1,2</sup>, Elisabeth Martin <sup>1,2</sup>, Isabelle Gross <sup>1,2</sup>, Claire Domon-Dell <sup>1,2</sup>,  
Jean-Noël Freund <sup>1,2,3</sup>**

<sup>1</sup> INSERM UMR\_S1113, 3 avenue Molière, 67200 Strasbourg, France

<sup>2</sup> Université de Strasbourg, Faculté de Médecine, FMTS, 67081 Strasbourg, France

<sup>3</sup> Address for correspondence:

Dr. Jean-Noël Freund

INSERM UMR\_S1113, 3 Avenue Molière, 67200 Strasbourg, France

Tel: (+33) 388 27 77 27; Fax (+33) 388 26 35 38

Email: jean-noel.freund@inserm.fr

**Running title:** Homeobox genes differently control DNA repair

## **ABSTRACT**

We report that the homeoproteins HoxB7 and Cdx2 exhibit different heterogeneous patterns in intestinal cancers, Cdx2 localizing in tumor regions with high to moderate differentiation whereas HoxB7 accumulates in poorly-differentiated regions. Both proteins are coexpressed in few cancer cells. Functional studies indicated that HoxB7 and Cdx2 interact with the KU70/80 complex involved in double-strand break DNA repair, but that they exert opposite effects on it in human colon cancer cells. Indeed, HoxB7 stimulated DNA repair and cell survival after treatment with a genotoxic agent, etoposide, whereas Cdx2 inhibited DNA repair and cell survival following etoposide. Truncated forms of HoxB7 revealed the need of the transactivation domain together with the homeodomain involved in the interaction with KU70/80 for its stimulatory effect on DNA repair. Unlike HoxB7, the inhibitory effect of Cdx2 on double-strand break DNA repair did not require the transactivation domain, but the homeodomain to interact with KU70/80 together with the C-ter domain. Hybrid forms between HoxB7 and Cdx2 showed first, that a heterologous transactivation domain, and not selectively the one of HoxB7, can mediate the stimulatory effect of DNA repair and second, that the inhibitory effect of the C-ter domain of Cdx2 is dominant over the stimulatory effect of a transactivation domain. In addition, the inhibitory effect exerted by Cdx2 overpassed the stimulatory effect of HoxB7, yet without competing HoxB7 for its interaction with KU70/80. In fact, we identified a new function of Cdx2 that interacts with HoxB7 to prevent the latter to bind its targets on chromatin, thus compromising the transcription-dependent stimulatory effect of HoxB7 on DNA repair. Together, these results reveal that the functional balance between HoxB7 and Cdx2 is a determinant of double-strand break DNA repair, and thus of the resistance to genotoxic stress, in colorectal cancer.

**Keywords:** homeobox gene, transcription, non-transcriptional, KU complex



## INTRODUCTION

Homeobox genes encode a large family of transcription factors that are major determinants of morphogenesis and cell differentiation during embryonic development. Mutations in human homeobox genes lead to congenital defects such as limb malformations, short stature, heart failure, craniofacial abnormalities, brain anomalies and even possibly autism spectrum disorder. Several of these genes remain expressed throughout adulthood and participate to the control of tissue homeostasis, while being deregulated in pathological settings among which leukemia and solid tumors<sup>1,2</sup>. The role of homeobox genes in cancer is widespread: in some cases they act as tumor suppressors, in other cases as oncogenes, and several homeogenes can even exhibit both anti-oncogenic and pro-oncogenic activities<sup>3</sup>.

The Hox-B cluster homeobox gene 7, HoxB7, is involved in axis patterning during embryonic development and becomes abnormally overexpressed in a variety of cancers including myeloma, breast, lung, ovarian, oral, pancreatic and colon cancers. Its overexpression is associated with poor prognosis, increased cell proliferation<sup>4,5</sup>, epithelial-mesenchymal transition<sup>6</sup>, tumor-associated angiogenic switch<sup>7</sup> and metastasis<sup>8,9</sup>. The paraHox cluster homeobox gene Cdx2 also has multiple developmental functions, and is central for intestinal identity determination and gut homeostasis<sup>10,11</sup>. However in contrast to HoxB7, the intestine-specific expression of Cdx2 is generally decreased and heterogeneous in colon cancer, which correlates with poor prognosis<sup>12-14</sup> and contributes to tumor progression and malignant cell dissemination<sup>15,16</sup>. Thus, HoxB7 is generally described as having an oncogenic potential, in contrast to Cdx2 considered as a tumor suppressor in the gut. Recently, beside their role of transcription regulators, HoxB7 and Cdx2 have been shown to control double-strand break (DSB) DNA repair activity. Indeed, in breast cancer cells, the oncogenic potential of HoxB7 has been linked to the ability of this homeoprotein to stimulate DSB DNA repair by interacting with the KU70/80 complex<sup>17</sup>. In contrast Cdx2, although interacting also with KU70/80, exerts an inhibitory effect on DSB DNA repair in colon cancer cells<sup>18</sup>.

On this basis, the purpose of this study was to investigate the particular impact of HoxB7 and Cdx2 homeoproteins on DSB DNA repair in colon cancer cells, and to decipher the corresponding molecular mechanism(s).

## RESULTS and DISCUSSION

### *Expression profiles of HoxB7 and Cdx2 in the murine gut and in gut tumors*

In a first attempt, we compared the expression patterns of the Cdx2 and HoxB7 homeoproteins in the mouse intestinal epithelium as well as in colon tumors induced by injections of a chemical carcinogen, Azoxymethane. In the normal epithelium, Cdx2 was present in the differentiated cells of the villi and in cells of the proliferating compartment, the crypts, except the Paneth cells, whereas HoxB7 was detected only in the crypts (Figure 1Aa). In colon tumors, Cdx2 became heterogeneous and ultimately very low to undetectable in the neoplastic glands with a strongly impaired structure. Conversely, HoxB7 immunostaining increased especially in tumor glands exhibiting a low level of Cdx2 (Figures 1Ab and 1B). However, in few neoplastic glands and/or in few cells within neoplastic glands, cell nuclei co-expressed Cdx2 and HoxB7, as assessed by double immunofluorescence staining (Figure 1B).

### *Opposite effects of HoxB7 and Cdx2 on DSB DNA repair in colon cancer cells*

Previous studies have reported that HoxB7 activates cell proliferation and tumorigenesis in colon cancers<sup>19</sup>, though it is not known if this homeoprotein also has any effect on DSB DNA repair in these tumor cells. To address this issue, we compared DSB DNA repair activity in colon cancer cells HCT116 and in cells overexpressing HoxB7. For this purpose, DSB DNA repair activity was determined using in vitro assays performed on nuclear extracts, and using in vivo assays in which the pG13-control reporter plasmid was cut between the SV40 promoter and the luciferase-encoding sequence prior to transfection, so that luciferase activity is produced only when plasmids are repaired within the transfected cells. The results shown in Figure 2A,B revealed that increasing the level of HoxB7 by transfection with the corresponding expression vector<sup>20</sup> stimulated DNA repair activity both in vitro and in vivo in colon cancer cells, consistent with the stimulatory effect on DSB DNA repair reported in mammary cancer cells<sup>17</sup>. In contrast to HoxB7, and corroborating our previous observations<sup>18</sup>, in vitro and in vivo assays showed that Cdx2 inhibited DSB DNA repair activity in colon cancer cells (Figure 2A,B). In mammary cells, the stimulatory effect exerted by HoxB7 on DSB DNA repair has been related to the ability of this homeoprotein to interact with the KU70/80 complex<sup>17</sup>. In colon cancer cells too, co-immunoprecipitation revealed that HoxB7 interacted with KU70/80 (Figure 2C). Like HoxB7, the Cdx2 homeoprotein exhibited

the ability to interact with the KU70/80 complex (Figure 2C). Thus, these results establish that, although both homeoproteins HoxB7 and Cdx2 can interact with the same protein partner, the KU70/80 complex, they exert opposite effects on DSB DNA repair in colon cancer cells, respectively a stimulatory effect for HoxB7 and an inhibitory effect for Cdx2.

#### *Relevance of HoxB7 and Cdx2 on cell survival after a genotoxic stress*

The functional relevance of Cdx2 and HoxB7 was investigated in colon cancer cells subjected to a genotoxic stress. For this purpose, human colon cancer cells HCT116 were transfected with expression plasmids encoding Cdx2 or HoxB7, treated for 24 h with the topoisomerase II inhibitor etoposide to induce double-strand breaks and allowed to recover for 2 weeks. As illustrated in Figure 2D, HoxB7 stimulated the survival of cells treated with etoposide, whereas Cdx2 reduced cell survival. Therefore, Cdx2 and HoxB7, which exert opposite effects on the activity of DSB DNA repair, have corresponding impacts on colon cancer cell survival after a genotoxic stress.

#### *Distinct domains of HoxB7 and Cdx2 involved in their opposite functions*

To explore the molecular mechanism(s) related to the opposite effects of Cdx2 and HoxB7 on DSB DNA repair, plasmids encoding truncated forms of these homeoproteins were constructed and used for in vitro and in vivo DNA repair assays. Every mutant contained the NLS sequence of the corresponding protein to ensure nuclear localization. The truncated protein made of the homeodomain and C-terminal region of Cdx2 but devoid of N-terminal transactivation domain (F-C2<sup>HD+Ct</sup>) was as efficient as full-length Cdx2 to inhibit DNA repair in vitro and in vivo; on the contrary, the homeodomain alone (F-C2<sup>HD</sup>) or only the N-terminal transactivation domain (F-C2<sup>Nt</sup>) lost this inhibitory effect (Figure 3Aa,b). Interestingly, co-immunoprecipitation revealed that F-C2<sup>HD+Ct</sup> as well as F-C2<sup>HD</sup> retained the capacity to interact with KU70/80, whereas the truncated form covering the transactivation domain, F-C2<sup>Nt</sup>, failed to do so (Figure 3Ac). These data show that the N-terminal transcription domain of Cdx2 is dispensable for DSB DNA repair inhibition, but this function needs the homeodomain to interact with KU70/80 together with the C-terminal domain. Similar truncated forms were constructed for HoxB7 and analyzed for their effect on DSB DNA repair using in vitro and in vivo assays. These experiments demonstrated that deleting the N-terminal transactivation domain in HoxB7<sup>HD+Ct</sup> abrogated the stimulatory effect on DSB DNA

repair and that the truncated forms restricted to the N-terminal transactivation domain (F-B7<sup>Nt</sup>) or to the homeodomain alone (F-B7<sup>HD</sup>) also failed to stimulate DNA repair (Figure 3Ba,b). Yet, despite their loss of function, F-B7<sup>HD+Ct</sup> and F-B7<sup>HD</sup> still conserved their capacity to interact with KU70/80, in contrast to the form overlapping the transactivation domain, F-B7<sup>Nt</sup> (Figure 3Bc). Thus, HoxB7 requires the transactivation domain to stimulate DSB DNA repair activity together with the homeodomain to interact with the KU70/80 complex. Since the HoxB7 effect on DSB DNA repair needs its transactivation domain while the protein also interacts with the KU70/80 complex, we investigated if this latter complex modulates the transcriptional activity of HoxB7. Using the reporter vector pTCBS containing multimerized consensus Hox binding elements<sup>21</sup>, we found indeed, that the transcriptional activity of HoxB7 on pTCBS was enhanced in the presence of KU70/80 (Figure 3C). Altogether, these results indicate first, that HoxB7 and Cdx2 require their homeodomains to bind to KU70/80 and second, that their specific and opposite effects on DSB DNA repair are depending on distinct domains: the C-terminal domain of Cdx2 to inhibit DNA repair and the N-terminal transactivation domain of HoxB7 to stimulate it.

To strengthen this conclusion, we constructed chimeric proteins composed of swapped domains of Cdx2 and HoxB7 and used them for in vitro and in vivo assays of DSB DNA repair. The chimeric protein F-C2<sup>Nt</sup>B7<sup>HD+Ct</sup> in which the N-terminal transactivation domain of Cdx2 was linked to the homeodomain and C-terminal part of HoxB7, was still able to stimulate DNA repair at a nearly similar level than HoxB7 (Figure 3D). This result indicated that a heterologous transactivation domain, and not selectively the one of HoxB7, can mediate the stimulatory effect of DNA repair. Conversely, the chimeric protein F-B7<sup>Nt</sup>C2<sup>HD+Ct</sup> in which the homeodomain and C-terminal domain of Cdx2 was linked to the N-terminal transactivation domain of HoxB7, inhibited DNA repair like the full-length Cdx2 and like the truncated form F-C2<sup>HD+Ct</sup>; moreover, the chimeric protein F-B7<sup>Nt+HD</sup>C2<sup>Ct</sup>, although not being inhibitor, failed to stimulate DSB DNA repair (Figure 3D). Together, these data provide strong evidence that the stimulatory effect of HoxB7 on DSB DNA repair depends on the transcriptional function of this homeoprotein, in contrast to the inhibitory effect exerted by Cdx2 which is linked to its HD+Ct domains. In addition, the inhibitory activity linked to the Cdx2 HD+Ct is dominant on the stimulatory effect mediated by the transactivation domains originating from either HoxB7 or Cdx2; the Ct domain of Cdx2 is crucial for this inhibitory effect while requiring its cognate HD for full activity.

### *Inhibitory effect of Cdx2 on the transcriptional function of HoxB7*

Considering that Cdx2 and HoxB7 can be co-expressed in some colon tumor cells and have opposite effects on DSB DNA repair, we next investigated the consequence of combining various amounts of Cdx2 and HoxB7 on DNA repair. In vivo DNA repair assays showed that the inhibitory effect of Cdx2 overpassed the stimulatory effect of HoxB7, unless the latter was in large excess (Figure 4A). In line with our above results revealing the inhibitory effect exerted by the transcription-deficient form F-C2<sup>HD+Ct</sup>, this form also overpassed the stimulatory effect of HoxB7, whereas the F-C2<sup>Nt</sup> form did not (Figure 4A). These results prompted us to check if Cdx2 and HoxB7 can belong to a common protein complex. As illustrated in Figure 4B, co-immunoprecipitation of HoxB7 revealed Cdx2, and the same result was obtained with F-C2<sup>HD+Ct</sup>. Interestingly, probing the HoxB7 / Cdx2 co-immunoprecipitate with antibodies against KU70/80 also demonstrated the presence of this heterodimer, which opened the possibility that KU70/80 could be a component of a larger ternary complex linking simultaneously HoxB7 and Cdx2. However, this hypothesis was ruled out by introducing ethidium bromide in the co-immunoprecipitation experiments. Indeed, ethidium bromide disrupted the interaction of KU70/80 with HoxB7 and also the interaction of KU70/80 with Cdx2, whereas the interaction of HoxB7 with Cdx2 was preserved (Figure 4C). This indicated that the presence of KU70/80 is not needed to create a complex between HoxB7 and Cdx2. We also noted that the amount of KU70/80 co-immunoprecipitated by HoxB7 was unchanged in the presence or absence of Cdx2 (Figure 4B); this precludes a mechanism in which Cdx2 would counteract the effect of HoxB7 on DSB DNA repair by competing with it for the binding to KU70/80. We therefore investigated if Cdx2 has any effect on the transcriptional activity of HoxB7 using the reporter plasmid pTCBS. As illustrated in Figure 4D, Cdx2 even at high dose did not significantly change luciferase activity encoded by this reporter, suggesting that the Cdx2 homeoprotein is not an efficient binding factor for these Hox sites. In contrast, HoxB7 strongly stimulated pTCBS luciferase activity. However, the stimulatory effect triggered by HoxB7 was dose-dependently reduced by Cdx2; moreover, the transcription-deficient form Cdx2<sup>HD+Ct</sup> also compromised the transcriptional activity of HoxB7. Together, these results demonstrate that Cdx2 exerts an inhibitory effect on HoxB7 irrespective of any transcriptional interference between these two homeoproteins, but resulting from the interaction between HoxB7 and Cdx2. Inversely, HoxB7 did not affect the transcriptional activity of Cdx2, as demonstrated using the CDH17-Luc reporter containing the promoter of a typical target of Cdx2, the LI-cadherin promoter

(Figure 4E). To investigate the mechanism by which Cdx2 counteracts the transcriptional activity of HoxB7, we performed chromatin-immunoprecipitation assays. As illustrated in Figure 4F, ChIP confirmed the binding of HoxB7 on its cognate DNA target sites, whereas Cdx2 did not bind to these sites. However, the presence of Cdx2 strongly inhibited the binding of HoxB7. This indicated that the Cdx2 protein does not compete with HoxB7 for DNA binding but that it physically interacts with HoxB7 to prevent the binding of the latter homeoprotein to its DNA target sites.

In conclusion, we reveal here that the two homeoproteins HoxB7 and Cdx2 exhibit opposite expression patterns in gut tumors, and also exert opposite effects on DSB DNA repair. Consequently, during the histopathological evolution to carcinoma, colon tumor cells enhance their capacity to repair DNA breaks first by increasing the expression of the stimulatory factor of DSB DNA repair, HoxB7, and second by decreasing the level of the inhibitory factor Cdx2. This may participate to the malignant phenotype of tumor cells, allowing them to overcome DNA breaks and to accumulate new mutations. Noteworthy, although both HoxB7 and Cdx2 exert their effects through the interaction of their homeodomain with the KU70/80 complex, the underlying molecular mechanisms are basically different, since it is transcriptional for HoxB7 but non-transcriptional for Cdx2. KU70/80 being not a limiting factor in the cell, this study suggests that HoxB7 and Cdx2 exert independent stimulatory and inhibitory effects on DSB DNA repair. In addition, it reveals a new activity for Cdx2 based on its interaction with HoxB7 to prevent the binding of the latter to its chromatin targets; therefore, Cdx2 compromises the transcription-dependent stimulatory effect of HoxB7 on DSB DNA repair. Targeting the regulatory mechanisms that control the balance between HoxB7 and Cdx2 could be a way to lessen to aggressiveness of tumor cells in colorectal cancer.

### **Acknowledgements**

We thank Dr V Zappavigna (Cornell University, New York, NY) and Dr S Park (John Hopkins University School of Medicine, Baltimore, MD) for providing the plasmids pTCBS and pCB6-Flag-HoxB7, respectively. This work was supported by Inserm (France), INCa #ACM-07 (France). C.S. was funded by the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (France) and by the Fondation pour la Recherche Médicale (France).

## REFERENCES

1. Samuel S, Naora H. (2005). Homeobox gene expression in cancer: insights from developmental regulation and deregulation. *Eur J Cancer*, **41**: 2428-2437
2. Shah N, Sukumar S. (2010). The Hox genes and their roles in oncogenesis. *Nat Cancer Rev*, **10**: 361-371
3. Yamaguchi T, Hosono Y, Yanagisawa K, Takahashi T. (2013). NKX2-1/TTF-1: an enigmatic oncogene that functions as a double-edged sword for cancer cell survival and progression. *Cancer Cell*, **23**: 718-723
4. De Souza Setubal Destro MF, Bitu CC, Zecchin KG, Graner E, Lopes MA, Kowalski LP, Coletta RD. (2010). Overexpression of HOXB7 homeobox gene in oral cancer induces cellular proliferation and is associated with poor prognosis. *Int J Oncol*, **36**: 141-149
5. Liao WT, Jiang D, Yuan J, Cui YM, Shi XW, Chen CM, Bian XW, Deng YJ, Ding YQ. (2011). HOXB7 as a prognostic factor and mediator of colorectal cancer progression. *Clin Cancer Res*, **17**: 3569-3578
6. Wu X, Chen H, Parker B, Rubin E, Zhu T, Lee JS, Argani P, Sukumar S. (2006). HOXB7, a homeodomain protein, is overexpressed in breast cancer and confers epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Res*, **66**: 9527-9534
7. Carè A, Felicetti F, Meccia E, Bottero L, Parenza M, Stoppacciaro A, Peschle C, Colombo MP. (2001). HOXB7: a key factor for tumor-associated angiogenic switch. *Cancer Res*, **61**: 6532-6539
8. Chen H, Lee JS, Liang X, Zhang H, Zhu T, Zhang Z, Taylor ME, Zahnow C, Feigenbaum L, Rein A, Sukumar S. (2008). Hoxb7 inhibits transgenic HER-2/neu-induced mouse mammary tumor onset but promotes progression and lung metastasis. *Cancer Res*, **68**: 3637-3644
9. Yuan W, Zhang X, Xu Y, Li S, Hu Y, Wu S. (2014). Role of HOXB7 in regulation of progression and metastasis of human lung adenocarcinoma. *Mol Carcinog*, **53**: 49-57
10. Gao N, White P, Kaestner KH. (2009). Establishment of intestinal identity and epithelial-mesenchymal signaling by Cdx2. *Dev Cell*, **16**: 588-599
11. Stringer EJ, Duluc I, Saandi T, Davidson I, Bialecka M, Sato T, Barker N, Clevers H, Pritchard CA, Winton DJ, Wright NA, Freund JN, Deschamps J, Beck F. (2012). Cdx2 determines the fate of postnatal intestinal endoderm. *Development*, **139**: 465-474
12. Brabletz T, Spaderna S, Kolb J, Hlubek F, Faller G, Bruns CJ, Jung A, Nentwich J, Duluc I, Domon-Dell C, Kirchner T, Freund JN. (2004). Down-regulation of the homeodomain

- factor Cdx2 in colorectal cancer by collagen type I: an active role for the tumor environment in malignant tumor progression. *Cancer Res*, **64**: 6973-6977
13. Baba Y, Nosho K, Shima K, Freed E, Irahara N, Philips J, Meyerhardt JA, Hornick JL, Shivdasani RA, Fuchs CS, Ogino S. (2009). Relationship of CDX2 loss with molecular features and prognosis in colorectal cancer. *Clin Cancer Res*, **15**: 4665-4673
  14. De Sousa E Melo F, Wang X, Jansen M, Fessler E, Trinh A, de Rooij LP, de Jong JH, de Boer OJ, van Leersum R, Bijlsma MF, Rodermond H, van der Heijden M, van Noesel CJ, Tuynman JB, Dekker E, Markowitz F, Medema JP, Vermeulen L. (2013). Poor-prognosis colon cancer is defined by a molecularly distinct subtype and develops from serrated precursor lesions. *Nat Med*, **19**: 614-618
  15. Bonhomme C, Duluc I, Martin E, Chawengsaksophak K, Chenard MP, Kedinger M, Beck F, Freund JN, Domon-Dell C. (2003). The Cdx2 homeobox gene has a tumour suppressor function in the distal colon in addition to a homeotic role during gut development. *Gut*, **52**: 1465-1471
  16. Gross I, Duluc I, Benameur T, Calon A, Martin E, Brabletz T, Kedinger M, Domon-Dell C, Freund JN. (2008). The intestine-specific homeobox gene Cdx2 decreases mobility and antagonizes dissemination of colon cancer cells. *Oncogene*, **27**: 107-15
  17. Rubin E, Wu X, Zhu T, Cheung JC, Chen H, Lorincz A, Pandita RK, Sharma GG, Ha HC, Gasson J, Hanakahi LA, Pandita TK, Sukumar S. (2007). A role for the HOXB7 homeodomain protein in DNA repair. *Cancer Res*, **67**: 1527-35
  18. Renouf B, Soret C, Saandi T, Delalande F, Martin E, Vanier M, Duluc I, Gross I, Freund JN, Domon-Dell C. (2012). Cdx2 homeoprotein inhibits non-homologous end joining in colon cancer but not in leukemia cells. *Nucl Acids Res*, **40**: 3456-3469
  19. Liao WT, Jiang D, Yuan J, Cui YM, Shi XW, Chen CM, Bian XW, Deng YJ, Ding YQ. (2011). HOXB7 as a prognostic factor and mediator of colorectal cancer progression. *Clin Cancer Res*, **17**: 3569-78
  20. Zappavigna V, Sartori D, Mavilio F. (1994). Specificity of HOX protein function depends on DNA-protein and protein-protein interactions, both mediated by the homeo domain. *Genes Dev*, **8**: 732-744
  21. Yaron Y, McAdara JK, Lynch M, Hughes E, Gasson JC. (2001). Identification of novel functional regions important for the activity of HOXB7 in mammalian cells. *J Immunol*, **166**: 5058-67



## FIGURES LEGENDS

### **Figure 1 Expression of the Cdx2 and HoxB7 homeoproteins in murine gut epithelium and tumours**

A. Immunohistochemical staining of Cdx2 and HoxB7 proteins in crypt and villus epithelial cells (**a**) and in serial sections of two distinct regions of an AOM-induced colon adenocarcinoma (**b**). Bars are 50  $\mu\text{m}$  in (**a**) and 100  $\mu\text{m}$  in (**b**). **B.** Co-immunofluorescence detection of Cdx2 and HoxB7 in an AOM-induced colon adenocarcinoma to illustrate the various patterns of these homeoproteins. Bars are 50  $\mu\text{m}$ . For tumor induction, AOM (Sigma, St Louis, MO) prepared in 150 mM NaCl was administrated once a week for five weeks and colon tumors were taken 30 weeks later. Immunodetection used mouse monoclonal anti-Cdx2 antibody (Biogenex, San Ramon, CA) and rabbit anti-HoxB7 antibody (Sigma Life Science). For immunohistochemical staining, secondary biotinylated anti-mouse and anti-rabbit antibodies were revealed using the Vectastain ABC kit (Vector Laboratories Inc, Burlingame, CA). For immunofluorescence detection, goat anti-mouse antibody labelled with Alexa488 and goat anti-rabbit antibody labelled with Alexa568 (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) were used as secondary antibody.

### **Figure 2 Opposite effects of Cdx2 and HoxB7 on DSB DNA repair activity and cell survival**

A. In vitro DSB DNA repair activity. **a.** Gel electrophoresis of SalI-linearized plasmid pRLnull incubated in the repair buffer without nuclear extract (-), and with nuclear extracts of HCT116 cells transfected with the control vector pFlag, with pF-Cdx2 or with pF-HoxB7. Arrowhead: linearized plasmid; asterisk: multimers resulting from DNA repair activity. **b.** Quantification of the multimers / linear ratio; the value of 1 was arbitrary attributed to the cell extracts of pFlag transfected HCT116. Data are given as means  $\pm$ SD for 4 independent experiments. **B.** In vivo DNA repair activity. **a.** Luciferase activity in HCT116 cells transfected with HindIII-linearized reporter plasmid pGl3-control together with pFlag, pF-Cdx2 or pF-HoxB7. The value of 1 was arbitrary given to pFlag-CMV2 transfected cells. Data are given as means  $\pm$ SD for 6 independent experiments. **C.** Interaction between KU70/80 and the Cdx2 and HoxB7 proteins. HCT116 cells were transfected with pFlag, pF-Cdx2 or pF-HoxB7. Western blots with anti-Flag or anti-KU70 / anti-KU80 antibodies were performed on crude cell extracts (input) and after immunoprecipitation with anti-Flag antibody (IP: @Flag). **D.** Impact of Cdx2 and HoxB7 on cell survival after etoposide

treatment. HCT116 cells were transfected with the plasmids pFlag, pF-Cdx2 or pF-HoxB7, treated with etoposide (20  $\mu$ M, Sigma Life Science) and cultured for 2 weeks. The numbers of clones are presented as the mean of three independent experiments in duplicates. Values were set at 1 for pFlag and are given as means  $\pm$ SD. See the Supplementary Informations for plasmid description, in vitro and in vivo DNA repair assays, coIPs and cell survival assays.

### **Figure 3      Functional domains of the Cdx2 and HoxB7 proteins**

**A.** Effect of truncated Cdx2 mutants on DSB DNA repair activity and interaction with KU70/80. **a.** In vitro DNA repair assays; data are expressed as the ratio between multimers and linear DNA, and given  $\pm$ SD for 3 independent experiments. **b.** In vivo DNA repair activity was determined by measuring luciferase activity in cells transfected with HindIII-linearized reporter plasmid pGI3-control together with plasmids encoding the indicated truncated proteins; data are given as means  $\pm$ SD for 5 independent experiments. **c.** Co-immunoprecipitation with anti-Flag antibody in HCT116 cells transfected with plasmids encoding the indicated Flag-tagged Cdx2 truncated proteins, followed by western blots with anti-Flag and anti-KU70 / anti-KU80 antibodies (inputs were omitted for clarity). **B.** Effect of HoxB7 truncated mutations on DSB DNA repair activity and interaction with KU70/80. The results are expressed as in (A). **a.** In vitro DNA repair assays. **b.** In vivo DNA repair assays. **c.** Co-immunoprecipitation with anti-Flag antibody in HCT116 cells transfected with the plasmids encoding Flag-tagged forms of HoxB7 truncated proteins, followed by western blots with anti-Flag and anti-KU70 / anti-KU80 antibodies (inputs were omitted for clarity). **C.** Transcription activity measured using the pTCBS reporter in HCT116 cells transfected with pFlag, pF-HoxB7 or together pF-HoxB7, pKU70 and pKU80 (F-HoxB7+KU70/80). Data are given  $\pm$ SD for 3 experiments. **D.** DSB DNA repair activity of chimeric proteins corresponding to swapped domains of the Cdx2 and HoxB7 proteins. The results are expressed as in (A). **a.** In vitro DNA repair assays. **b.** In vivo DNA repair assays. Plasmids construction, in vitro and in vivo DNA repair assays, and coIPs were performed as described in Supplementary Informations.

### **Figure 4      Interference between HoxB7 and Cdx2 for DSB DNA repair activity**

**A.** In vivo DSB DNA repair activity was determined by measuring luciferase activity in cells transfected with HindIII-linearized reporter plasmid pGI3-control together with the indicated amount of plasmids (ng) encoding F-HoxB7 and F-Cdx2 or the truncated forms of Cdx2. The value of 1 was arbitrary given to control pFlag transfected cells. Data are given as means  $\pm$ SD

for 4 independent experiments. **B.** Co-immunoprecipitation with anti-Flag antibody in HCT116 cells transfected with pFlag or pF-HoxB7 together with the plasmids encoding HA-tagged Cdx2 (H-Cdx2) or C2<sup>HD+Ct</sup> (H-C2<sup>HD+Ct</sup>), followed by western blots with anti-Flag, anti-HA and anti-KU70 / anti-KU80 antibodies (inputs were omitted for clarity). **C.** Stability of the protein complexes in the presence of Ethidium Bromide (EB). Cells were transfected with pHA-Cdx2 and proteins were coimmunoprecipitated with anti-HA antibody, or they were transfected with pFlag or pF-HoxB7 and proteins were coimmunoprecipitated with anti-Flag antibodies. Co-immunoprecipitations were performed in the absence or presence of EB. Western blots used anti-Flag, anti-HA and anti-KU70 / anti-KU80 antibodies (inputs were omitted for clarity). **D.** Effect of Cdx2 on the transcriptional activity of HoxB7. Cells were transfected with the reporter plasmid pTCBS together with the indicated amounts (ng) of plasmids pF-HoxB7, pF-Cdx2 or pF-C2<sup>HD+Ct</sup>. Luciferase data are given as means  $\pm$ SD for 3 independent experiments. **E.** Effect of HoxB7 on the transcriptional activity of Cdx2. Cells were transfected with the reporter plasmid pCDH17-Luc together with the indicated amounts (ng) of plasmids pCdx2 and pF-HoxB7. **F.** Chromatin immunoprecipitation using anti-Flag antibody (grey boxes) or control IgG (white boxes) of HCT116 cells transfected with the plasmids pFlag, pF-HoxB7 and/or pF-Cdx2. The results of qPCR are expressed as percent of input.

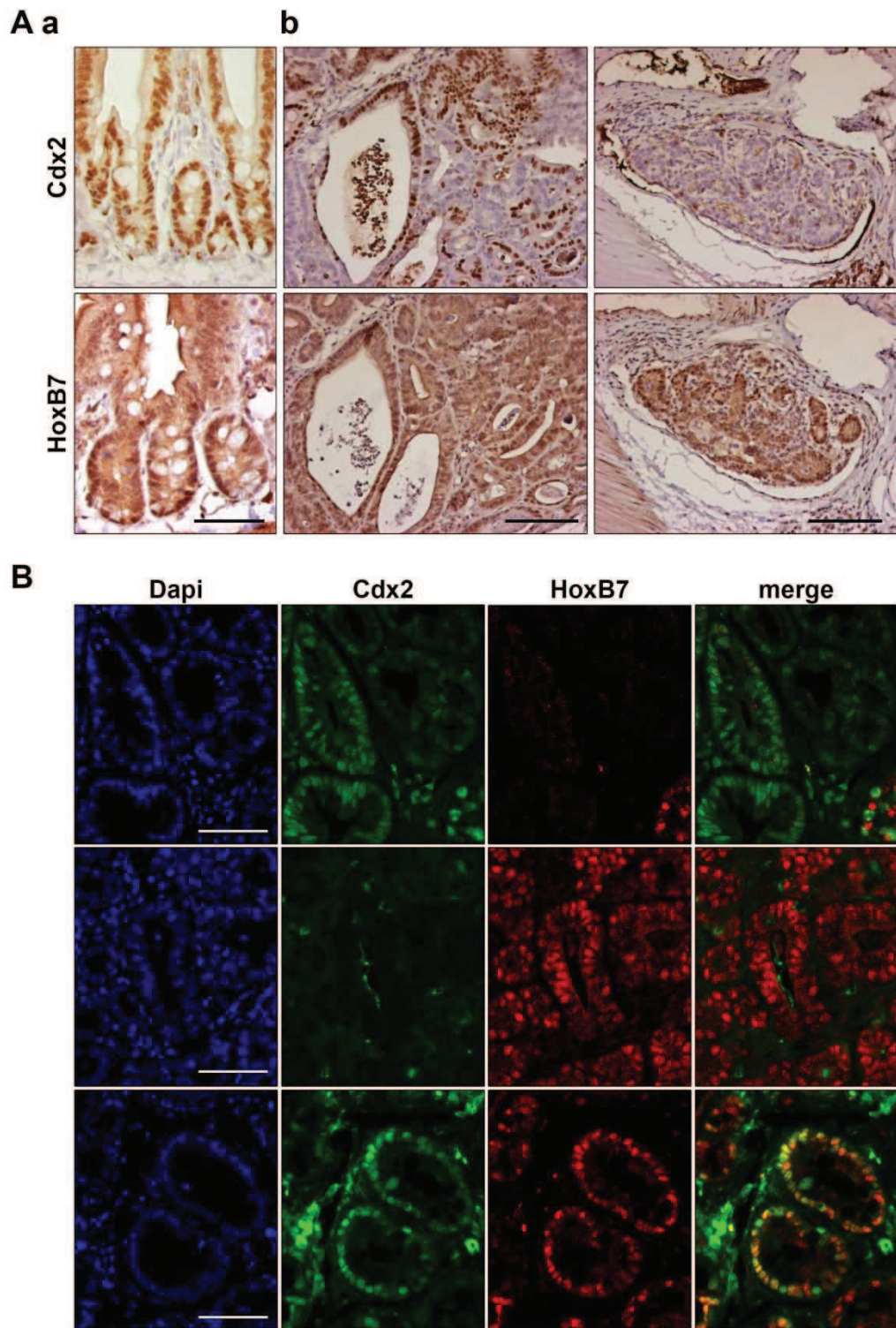


Figure 1

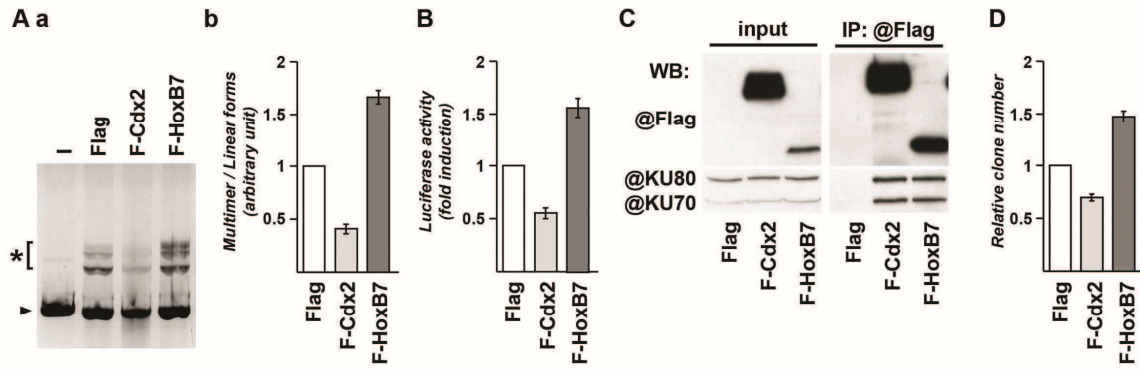


Figure 2

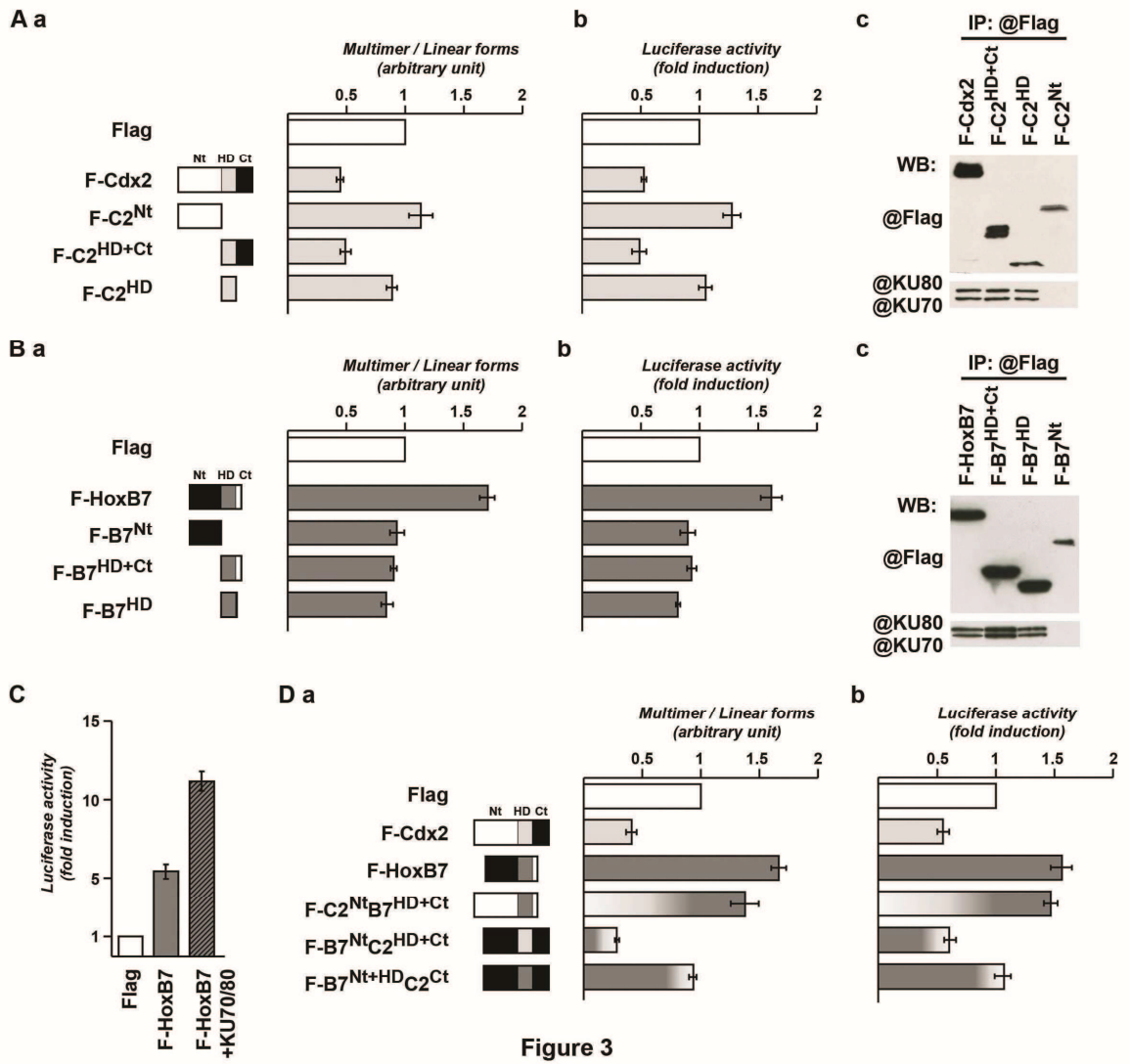


Figure 3

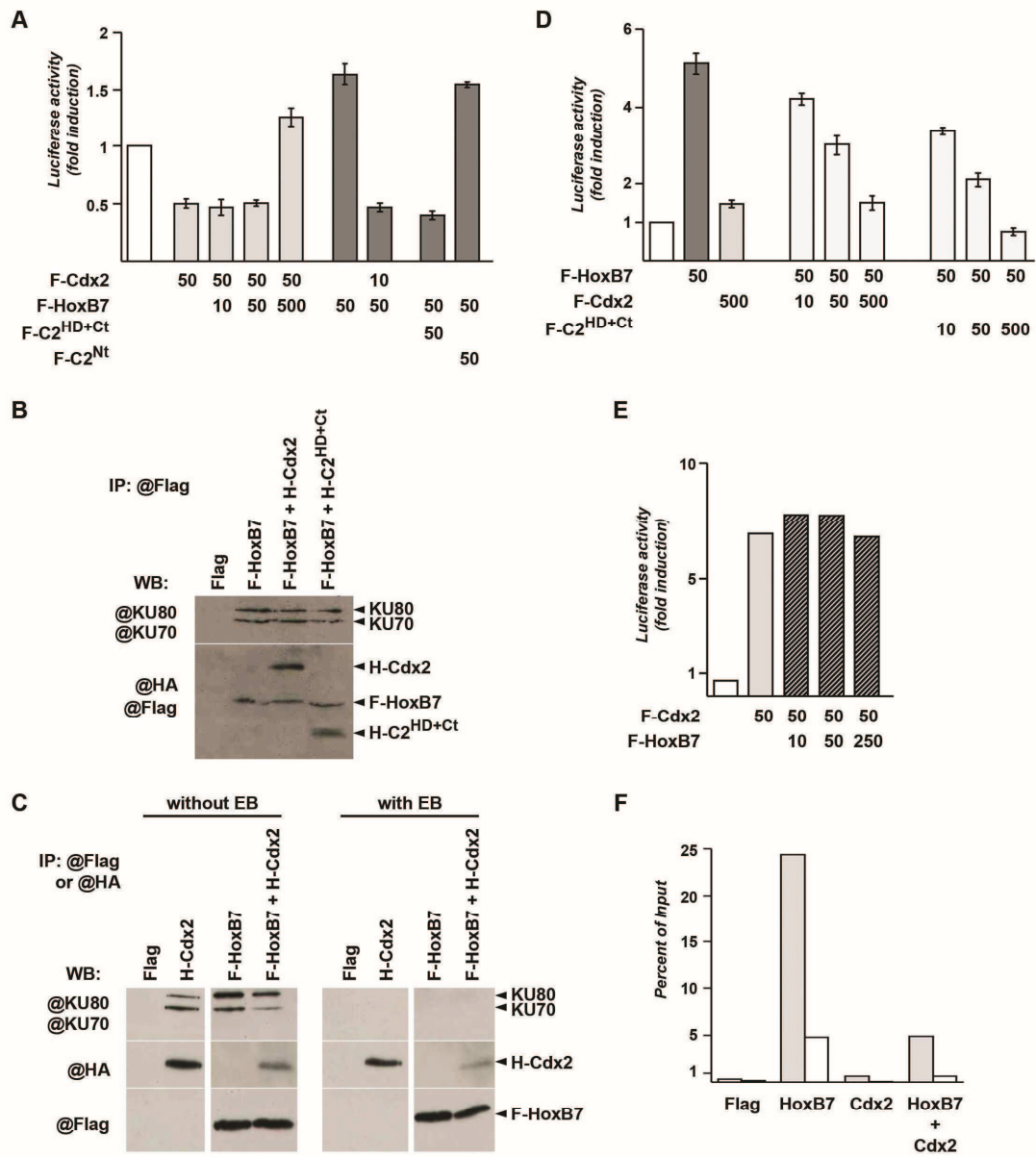


Figure 4

## SUPPLEMENTARY INFORMATION

### MATERIAL and METHODS

#### *Mice, cell lines and transfections*

Mice, housed according to the guidelines of the Ethic Committee of the University of Strasbourg, were injected intraperitoneally with Azoxymethane (AOM, Sigma Life Science, Saint-Louis, MO) at 10 mg/kg in 150 mM NaCl once a week for 5 weeks. Animals were killed 25 weeks later to dissect out colon tumors.

Human colon cancer cells HCT116 were grown as recommended (Brattain *et al*, 1981). Standard transfections were performed with JetPRIME, or with JetPEI for luciferase assays, according to the recommendations of the supplier (Polyplus Transfection, Illkirch, France).

#### *Plasmids and antibodies*

We previously constructed the plasmids encoding Cdx2 and truncated mutants: pF-Cdx2, pF-C2<sup>HD+Ct</sup> (pCdx2[175-313]), pF-C2<sup>HD</sup> (pCdx2[175-250]), pF-C2<sup>Nt</sup> (pCdx2[1-220]), as well as the luciferase reporter plasmid pCDH17-Luc containing the LI-cadherin gene promoter (Renouf *et al*, 2012). Plasmid pHA-Cdx2 and pHA-C2<sup>HD+Ct</sup> (?). The expression plasmid pCDNA3-FlagHoxb7 (pF-HoxB7) (Yaron *et al*, 2001) and the Hox reporter pTCBS (Zappavigna *et al*, 1994), as well as the plasmids encoding KU70 and KU80 (Brenkman *et al*, 2010) have been described. Deletion mutants for HoxB7 were constructed by PCR amplification using specific primers containing restriction sites for HindIII (forward) or XbaI (reverse), and subcloning the PCR fragments into the corresponding sites of the vector pCDNA3 (Invitrogen Life Technologies, Saint-Aubin, France). The primers were: AAAAAGCTTGATAAGGATCCATGGACTACAAAGACGATGACGATAAAGAATTC / AAATCTAGATCAGATCTCGATGCGCCGCCGCCGCGTCAG for pF-B7<sup>Nt</sup>, AAAAAGCTTGATAAGGATCCATGGACTACAAAGACGATGACGATAAAGGAACTG ACCGCAAACGAGGCCGCCA / AAATCTAGATCACTCTTCCTCTTCCTCCTCTGCTTCAG for pF-B7<sup>HD+Ct</sup> and AAAAAGCTTGATAAGGATCCATGGACTACAAAGACGATGACGATAAAGGAACTG ACCGCAAACGAGGCCGCCA / AAATCTAGATCACTTGTTCTCCTTTTTCCACTTCATGC for pF-B7<sup>HD</sup>. Plasmids encoding chimeric proteins were obtained after creating by site-directed mutagenesis AfeI and AflII restriction sites at equivalent positions into pF-Cdx2 and pF-HoxB7 (Quikchange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit, Agilent Technologies, Santa Clara, CA). The mutagenesis primers were AAATCAACAAGAAAGCGCTGCAGCAGCAACAG for AfeI and GCGCAGCAGTCCCTCTTAAGCCAAGTGAAAACC for AflII in pF-Cdx2, and GGAGAACAAGACAGCGCTCCCGGGGACCAC for AfeI and GATGCGAAGCTCCTTAAGTGACCGCAAACGA for AflII in pF-HoxB7. To construct pF-B7<sup>Nt+HD</sup>C2<sup>Ct</sup>, the mutated form of pF-HoxB7 was cut with NdeI and AfeI and the fragment was inserted into the NdeI / AfeI sites of mutated pF-Cdx2. Similarly, the NdeI-AflII fragment of mutated pF-HoxB7 was inserted into the NdeI / AflII sites of mutated pF-Cdx2 to get pF-B7<sup>Nt</sup>C2<sup>HD+Ct</sup>, and the NdeI-AflII fragment of mutated pF-Cdx2 was inserted into the NdeI-AflII of mutated pF-HoxB7 to get pF-C2<sup>Nt</sup>B7<sup>HD+Ct</sup>.

Primary antibodies were: mouse anti-Flag (M2 affinity purified, Sigma Life Science, St Louis, MO, USA), mouse anti-HA (Roche, Mannheim, Germany), rabbit monoclonal anti-Ku70 (Abcam, Cambridge, MA, USA), rabbit monoclonal anti-Ku80 (Abcam, Cambridge, MA),



mouse anti-Cdx2 (BioGenex, San Ramon, CA, USA), rabbit anti-Hoxb7 (Sigma Life Science, HO291). Secondary HRP-conjugated antibodies anti-mouse (mouse TrueBlot Ultra, eBioscience, San Diego, CA), anti-rabbit and anti-rat (GE company, Fairfield, CT) were used for ECL detection (GE company). Goat anti-mouse antibody labelled with Alexa488 (Invitrogen) and goat anti-rabbit antibody labelled with Alexa568 (Invitrogen) were used as secondary antibody and detected using an Axio Imager (Zeiss, Jena Germany).

### ***Cell survival assays***

After 24 hours of transfection, HCT116 cells were treated for 24 hours with 20 $\mu$ M of etoposide (Sigma Life Science) in the culture medium. They were then trypsinized and 10<sup>5</sup> cells were seeded in culture medium and grown for 2 weeks. Cell colonies were fixed with 70% ethanol, stained with 0.1% crystal violet and counted using ImageJ software (W Rasband, Bethesda, MA).

### ***DSB DNA repair assays***

For the in vivo assays, pGL3-control plasmid was cut by HindIII and purified using Qiagen PCR purification kit (Qiagen, Hilden, Germany). HCT116 cells (1.5 x 10<sup>6</sup>) were co-transfected with 250 ng of cut pGL3-control, with various amounts of plasmids encoding Cdx2, HoxB7 or mutated forms of these homeoproteins and with pRL-null as an internal control (Promega, Madison, WI). Forty-eight hours after transfection, Firefly and Renilla luciferase activities were measured using the dual reporter luciferase assay (Promega, Madison, WI) and a Lumistar luminometer (BMG, Offenbourg, Germany).

For the in vitro assays, cell extracts were prepared as described previously (Renouf et al, 2012). End-joining reactions were performed during 1 hour at 25°C using 250 ng of plasmid pRL-null previously cut with SalI and 20  $\mu$ g of nuclear extracts in a final volume of 20  $\mu$ L containing 20 mM Hepes-KOH pH 7.4, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 80 mM KCl, 1 mM ATP, 1 mM DTT and protease inhibitor cocktail. The reaction was stopped by adding 0.5% SDS, 50 mM EDTA and 1  $\mu$ g/ $\mu$ L of proteinase K and incubated for 1 hour at 37°C. DNA was purified by phenol / chloroform extraction and separated by electrophoresis on a 0.7 % agarose gel at 2 V/cm. DNA bands were visualized using Ethidium Bromide and UV illumination and quantified by the ImageJ software.

### ***Immunoprecipitation and Western lots***

Forty-eight hours after transfection, cells were lysed 10 min in lysis buffer containing 10 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100 and protease inhibitor cocktail (Roche, Mannheim, Germany). The lysate was centrifuged for 10 min at 20,000 g at 4°C. Immunoprecipitation was performed on 1 mg of protein with 30  $\mu$ L anti-Flag beads (Anti-Flag M2 Affinity Gel, Sigma Life Science) or anti-HA beads (Anti-HA Affinity Matrix, Roche), for 2 hours at 4°C in 1 mL of lysis buffer. Immunoprecipitates were washed 3 times in lysis buffer and eluted with SDS-PAGE sample loading buffer (Biorad, Hercules, CA). When indicated, HCT116 cell extracts (1 mg) were treated for 30 min with 400  $\mu$ g/mL Ethidium Bromide (EtBr) prior to the addition of the beads. Cell extracts or immunoprecipitates were analyzed separated by SDS-PAGE, Western blot followed by ECL detection (GE Company, Fairfield, CT).

### ***Luciferase assays***

HCT116 cells (1.5 x 10<sup>6</sup>) were co-transfected with the reporter plasmid pTCBS (250 ng), with the plasmids encoding F-HoxB7, F-Cdx2 or mutated forms, and with pRL-null as internal control (Promega, Madison, WI, USA). Firefly and Renilla luciferase activities were

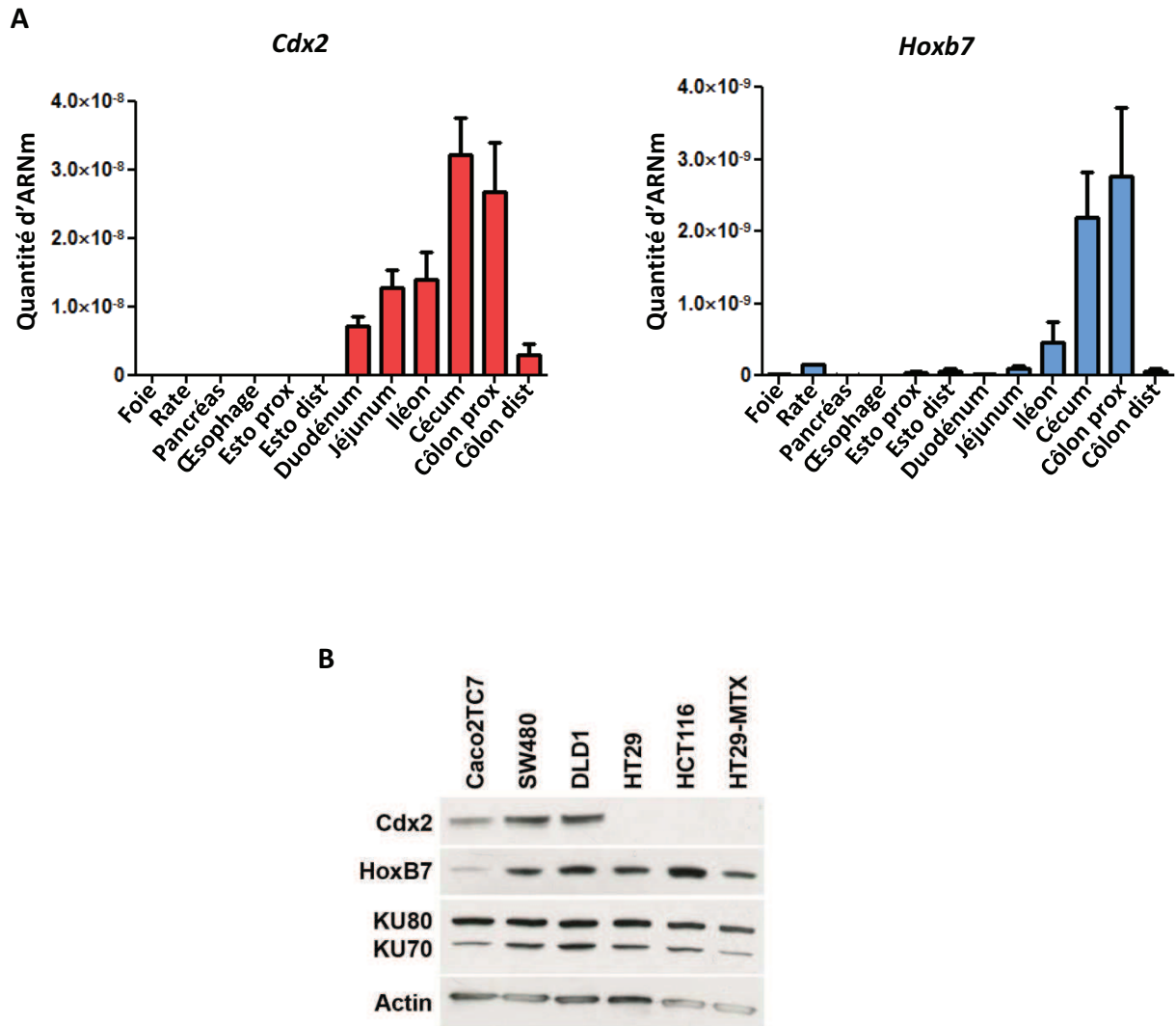
measured 48 hours after transfection using a dual reporter luciferase assay (Promega) with a Lumistar luminometer (BMG, Offenbourg, Germany).

### ***Chromatin Immunoprecipitation (ChIP)***

Chromatin Immunoprecipitation was performed using Magna ChIP G kit (Millipore, Darmstadt, Germany) following the instructions of the supplier with few modifications. HCT116 cells ( $10^6$  for each ChIP experiment) were co-transfected with the plasmids pF-HoxB7 and/or pF-Cdx2 together with pTCBS. After cell disruption in 50  $\mu$ L of Cell Lysis Buffer and sonication using a Bioruptor (Diagenode, Seraing, Belgium) for 12 min, chromatin immunoprecipitation was performed with anti-Flag antibody (M2 affinity purified, Sigma Aldrich) and G magnetic beads overnight at 4°C. Co-immunoprecipitated DNA was purified using Qiagen PCR purification kit (Qiagen, Hilden, Germany) and eluted in 35  $\mu$ L of EB buffer. Two  $\mu$ L of purified DNA were used for quantitative real time PCR with FastStart Sybr Green Master (Roche) and primers flanking the HoxB7 binding sites in pTCBS (CTCAGATCCAAGCTTGTCGA / TTCGAATTCGCCAATGACAAGA).

### ***References***

- Brattain MG, Fine WD, Khaled FM, Thompson J, Brattain DE. (1981). Heterogeneity of malignant cells from a human colonic carcinoma. *Cancer Res*, **41**: 1751–1756
- Brenkman AB, van den Broek NJ, de Keizer PL, van Gent DC, Burgering BM. (2010). The DNA damage repair protein Ku70 interacts with FOXO4 to coordinate a conserved cellular stress response. *Faseb J*, **24**: 4271-80
- Renouf B, Soret C, Saandi T, Delalande F, Martin E, Vanier M, Duluc I, Gross I, Freund JN, Domon-Dell C. (2012). Cdx2 homeoprotein inhibits non-homologous end joining in colon cancer but not in leukemia cells. *Nucl Acids Res*, **40**: 3456-3469
- Yaron Y, McAdara JK, Lynch M, Hughes E, Gasson JC. (2001). Identification of novel functional regions important for the activity of HOXB7 in mammalian cells. *J Immunol*, **166**: 5058-67
- Zappavigna V, Sartori D, Mavilio F. (1994). Specificity of HOX protein function depends on DNA-protein and protein-protein interactions, both mediated by the homeo domain. *Genes Dev*, **8**: 732-744



**Figure 44. Profils d'expression de *Cdx2* et *Hoxb7*.**

L'expression endogène de *Cdx2* et *Hoxb7* est mesurée par PCR semi-quantitative dans différentes parties du tube digestif murin sain (A). Le niveau protéique de CDX2, HOXB7 et KU70/80 est observé par Western blot dans différentes lignées cancéreuses coliques (B).

### 3. Profils d'expression des gènes *Cdx2* et *Hoxb7*

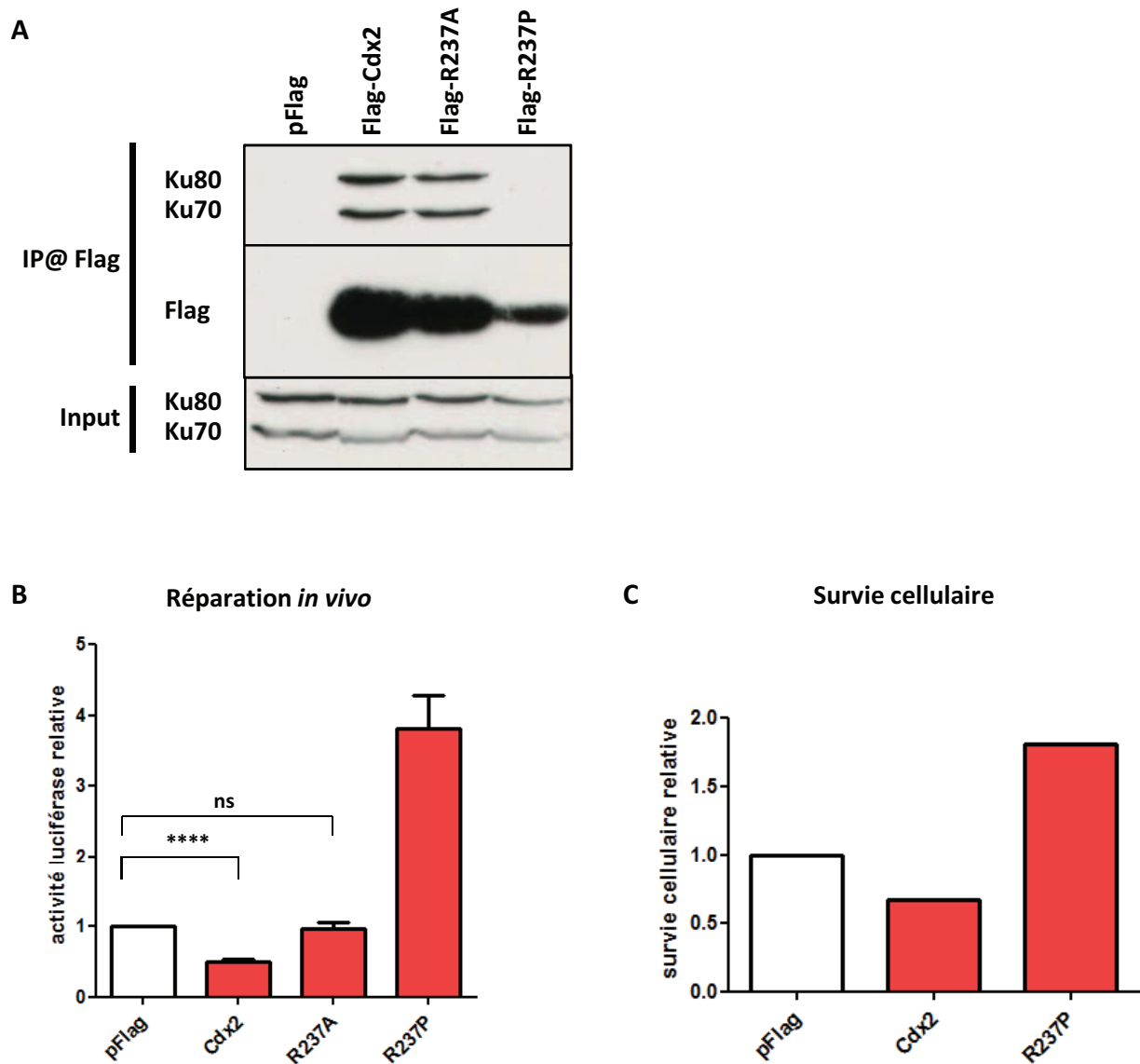
L'expression endogène de *Cdx2* et *Hoxb7* est mesurée par PCR quantitative dans différentes parties du tube digestif murin sain (Fig. 44A). *Hoxb7* et *Cdx2* ont le même profil d'expression : leur concentration est croissante du duodénum jusqu'au côlon proximal puis décroissante vers le côlon distal. Cependant, *Hoxb7* s'exprime à un niveau bien plus faible que celui de *Cdx2*.

L'expression endogène de *Cdx2*, *Hoxb7* et *Ku70/80* est évaluée au niveau protéique dans différentes lignées cancéreuses coliques par Western blot (Fig. 44B). Chaque lignée cellulaire exprime *Cdx2* et *Hoxb7* à des niveaux différents et sans corrélation : certaines lignées expriment l'un ou l'autre, d'autres expriment les deux. KU70/80 sont des protéines ubiquitaires et s'expriment bien dans l'ensemble des lignées cellulaires testées.

## 4. Mécanismes potentiels de régulation de l'activité de réparation de CDX2 et HOXB7

### A. L'homéodomaine et ses sites de fixation à l'ADN

CDX2 exerce une fonction indépendante de son domaine de transactivation sur la réparation des cassures de l'ADN par le mécanisme du NHEJ, passant par son homéodomaine. CDX2 agit également sur le cycle cellulaire de cette manière. En effet, CDX2 stabilise la protéine p27<sup>Kip1</sup> indépendamment de son activité transcriptionnelle mais via son homéodomaine (Aoki et al., 2011). Pour aborder cette question, plusieurs mutants ponctuels de CDX2 affectant des acides aminés situés dans l'homéodomaine et responsables de sa fixation sur l'ADN de gènes cibles ont été construits sur la base des données structurales et fonctionnelles définies pour les homéodomains (Gehring et al., 1994). Les mutants R237A et R237P perdent leur capacité à lier l'ADN et donc leur activité transcriptionnelle sur un des gènes cibles de CDX2, le gène *cdh17* codant pour la *LI-cadhérine* (Aoki et al., 2011). En revanche, le mutant R237A garde sa fonction inhibitrice sur la prolifération cellulaire, mais pas le mutant R237P pour lequel le changement d'une arginine en proline induit potentiellement la formation d'un coude dans la structure tridimensionnelle de la protéine. Ceci suggère donc que l'homéodomaine est nécessaire pour inhiber la prolifération cellulaire, indépendamment de la capacité de ce domaine à interagir avec l'ADN.



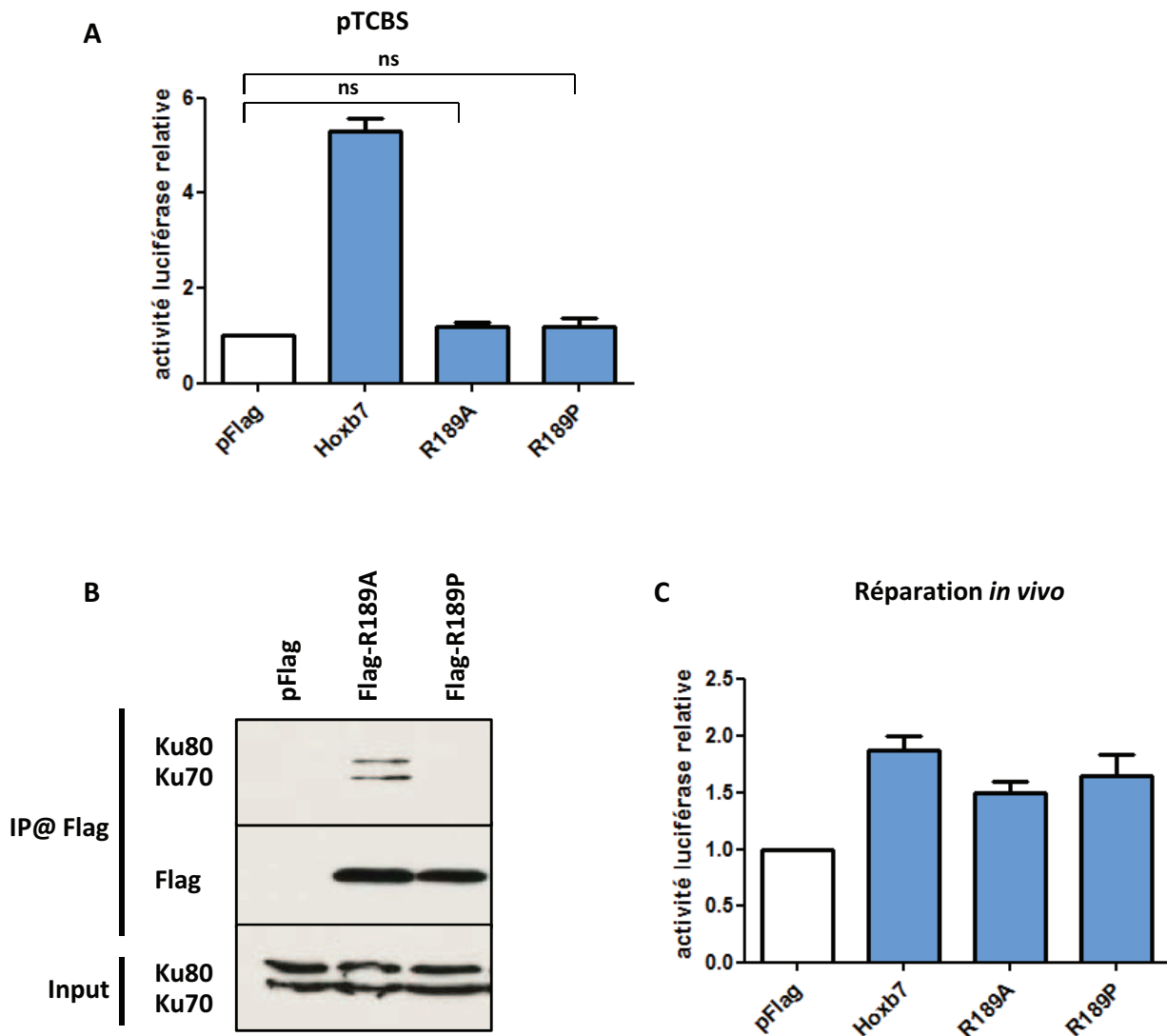
**Figure 45. La mutation de l'arginine 237 de CDX2.**

Les cellules HCT116 sont transfectées avec le vecteur pFlag, Flag-Cdx2, Flag-R237A ou Flag-R237P. Un mg de protéines sont immunoprécipitées avec un anticorps anti-Flag puis révélées par Western blot avec les anticorps anti-Flag et anti-KU70/80 (A). L'activité de réparation des mutants ponctuels est évaluée en quantifiant la religation d'un plasmide linéarisé codant pour la luciférase par un test mesurant l'activité de la luciférase. Les valeurs sont normalisées par le contrôle interne, la luciférase Rénilla, puis l'activité pour le vecteur vide est rapportée à 1 (B). Vingt-quatre heures après transfection, les cellules HCT116 sont traitées à l'étoposide (20mM pendant 24h) puis mises en culture pendant 2 semaines. La survie est évaluée en comptant le nombre de colonies puis le nombre pour le vecteur vide est rapporté à 1 (C). (ns : non-significatif  $P > 0,05$ ) (\*\*\*\*  $P < 0,0001$ )

Une activité non-transcriptionnelle de CDX2 peut donc être inhibée par la mutation de l'arginine 237 en proline. Cette mutation affecte-t-elle également une autre fonction non-transcriptionnelle impliquant l'homéodomaine de CDX2, à savoir l'inhibition de la réparation des cassures double-brins de l'ADN ? Pour cela, j'ai construit les mutants équivalents flagués R237A et R237P (Fig. 54 Matériels et Méthodes).

La co-immunoprécipitation montre que le mutant R237A conserve son interaction avec les protéines KU70/80. En revanche, le changement de l'arginine 237 en une proline, abolit l'interaction, démontrant, une nouvelle fois, la nécessité de l'homéodomaine de CDX2 pour son interaction avec les protéines KU (Fig. 45A). Les expériences de réparation *in vivo* en luciférase, révèlent que le mutant R237A perd son activité inhibitrice sur la réparation alors que le mutant R237P, de manière inattendue, possède une forte activité stimulatrice (Fig. 45B). Par conséquent, contrairement à la protéine CDX2 sauvage, le mutant R237P stimule la survie cellulaire après traitement par un agent génotoxique (Fig. 45C). Ceci démontre, en outre, que tout comme pour la stabilisation p27Kip1, CDX2, pour inhiber la réparation de l'ADN, a besoin d'un homéodomaine intact. Parallèlement, nous avons montré que l'interaction de CDX2 avec les protéines KU est dépendante de l'ADN puisque cette interaction n'est plus révélée si l'on réalise les co-immunoprécipitations en présence de bromure d'éthidium, qui perturbe la structure de la double hélice (Renouf et al., 2012). Cependant, le mécanisme moléculaire par lequel CDX2 passe d'inhibiteur à stimulateur, en substituant une arginine par une proline, bien que très intéressant, reste à élucider.

J'ai également réalisé des mutants équivalents dans le cas de l'homéoprotéine HOXB7 car cette arginine fait partie d'une séquence très bien conservée au cours de l'évolution. Elle correspond à l'arginine en position 189 de la protéine HOXB7. Dans un premier temps, j'ai montré que ces mutants ne sont plus transcriptionnellement actifs : les mutants R189A et R189P ont perdu leur capacité à activer le promoteur du vecteur rapporteur de HOXB7, le vecteur pTCBS, constitué de plusieurs éléments de réponses aux HOX placés en amont de la séquence codant pour la luciférase (Fig. 46A). Des expériences de co-immunoprécipitation démontrent, comme pour CDX2, une perte de l'interaction avec KU70/80 lorsque l'arginine est mutée en proline (Fig. 46B). Enfin, dans les tests de réparation, alors qu'une perte de l'effet stimulateur de HOXB7 est attendue, aucune modification significative de la stimulation n'est observée, aussi bien pour le mutant R189A que le mutant R189P. Ce résultat indique que, bien que l'activité stimulatrice de HOXB7 sur la réparation nécessite son domaine de transactivation, elle ne semble pas passer par son activité transcriptionnelle. Néanmoins, puisque le mutant équivalent de CDX2 passe d'inhibiteur à activateur de la réparation de l'ADN par



**Figure 46. La mutation de l'arginine 189 de HOXB7.**

L'activité de HOXB7 et des mutants ponctuels R189A et R189P est mesurée grâce à un plasmide rapporteur pTCBS contenant la séquence de la luciférase sous le contrôle d'un promoteur possédant des sites de fixation pour les gènes *Hox*. L'activité de la luciférase est normalisée par l'activité de la Rénilla puis celle du vecteur vide est rapportée à 1 (A). Les cellules HCT116 sont transfectées avec le vecteur pFlag, Flag-R189A ou Flag-R189P. Un mg de protéines sont immunoprécipitées avec un anticorps anti-Flag puis révélées par Western blot avec les anticorps anti-Flag et anti-KU70/80 (B). L'activité de réparation *in vivo* des mutants ponctuels est évaluée en quantifiant la religation d'un plasmide linéarisé codant pour la luciférase par un test mesurant son activité. Les valeurs sont normalisées par le contrôle interne, la luciférase Rénilla, puis l'activité pour le vecteur vide est rapportée à 1 (C). (ns : différences non-significative  $P > 0,05$ ).

un mécanisme moléculaire encore inconnu, il est envisageable que le mutant R189P de HOXB7, bien que transcriptionnellement inactif, utilise le même mécanisme que le mutant R237P de CDX2 pour activer la réparation de l'ADN.

## B. Modifications post-traductionnelles et effets sur la réparation

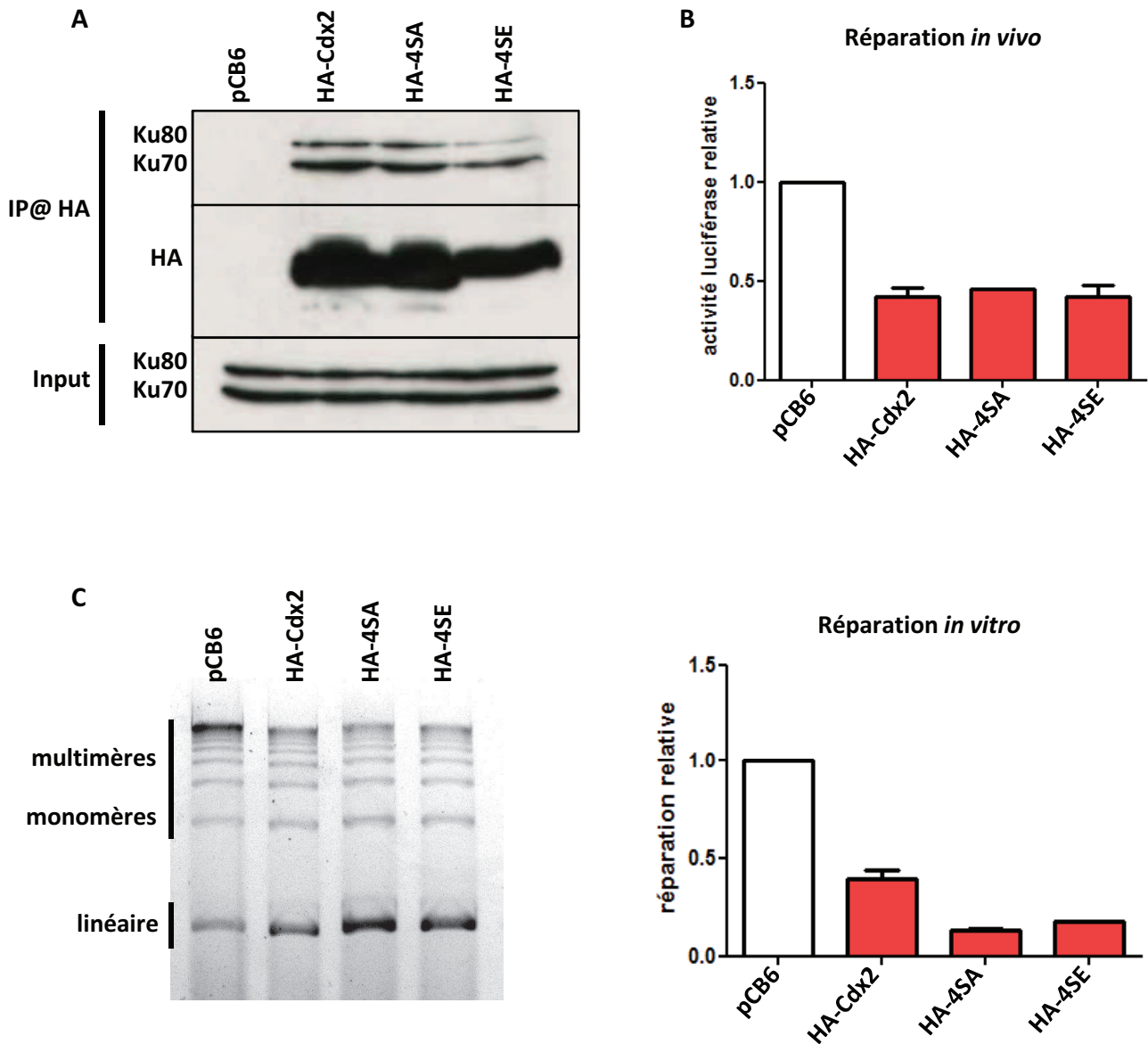
Une des façons de réguler l'activité d'un facteur de transcription est de jouer sur ses modifications post-traductionnelles qui peuvent changer ses interactions ou sa fixation sur ses gènes cibles. Plusieurs types de modifications post-traductionnelles ont été décrits mais je me suis concentrée sur l'effet de la phosphorylation et de l'ADP-ribosylation de CDX2 et HOXB7 sur leur activité de régulateur de la réparation de l'ADN.

### a. Les phosphorylations

La phosphorylation est l'ajout d'un groupement phosphate par une protéine kinase, à partir d'une molécule d'ATP, sur une protéine, le plus généralement, au niveau d'acides aminés tels que la sérine, thréonine ou tyrosine. CDX2 est phosphorylée au niveau d'un motif de quatre sérines présent dans la partie C-terminale de CDX2 et qui est important pour la stabilité de la protéine (Gross et al., 2005). Ceci a été mis en évidence au laboratoire grâce à la construction de plasmides codant pour des mutants de la protéine CDX2 de souris mimant la phosphorylation de ces sérines (changement des sérines en un acide glutamique : mutant 4SE) ou l'empêchant (mutation d'une sérine en alanine : mutant 4SA). Nous avons vu, à partir des mutants de délétion testés, que la partie C-terminale de la protéine CDX2 est essentielle pour son activité inhibitrice sur la réparation de l'ADN. La phosphorylation de ces sérines a-t-elle un impact sur cette activité ? Pour répondre à cette question, nous avons analysé les conséquences de la mutation de ces sites de phosphorylation sur la réparation. J'ai construit les plasmides codant pour les mutants de la protéine humaine de CDX2 flagués que j'ai testés dans des tests de co-immunoprécipitation et de réparation de l'ADN (Fig. 56 Matériels et Méthodes).

Les résultats montrent que le mutant 4SA, ainsi que le mutant 4SE, conservent l'interaction avec les protéines KU70/80 (Fig. 47A). En outre, les tests de réparation de l'ADN, *in vivo* et *in vitro*, révèlent que ces mutants sont, tout comme la protéine CDX2 sauvage, inhibiteurs de la réparation





**Figure 47. Rôle de la phosphorylation de CDX2 sur la réparation de l'ADN.**

Les 4 sérines de la partie C-terminale de CDX2 sont mutées en alanine (empêche la phosphorylation) ou en acide glutamique (mime la phosphorylation). Les cellules HCT116 sont transfectées avec le vecteur pCB6, HA-Cdx2, HA-4SA ou HA-4SE. Un mg de protéines sont immunoprécipitées avec un anticorps anti-HA puis révélées par Western blot avec les anticorps anti-HA et anti-KU70/80 (A). L'activité de réparation *in vivo* des mutants de phosphorylation est évaluée en mesurant l'activité de la luciférase. Les valeurs sont normalisées par le contrôle interne, la luciférase Rénilla, puis l'activité pour le vecteur vide est rapportée à 1 (B). La réparation *in vitro* s'observe par l'apparition de monomères et multimères du vecteur pRLnull préalablement digéré par Sall puis mis en présence d'extraits nucléaires surexprimant *Cdx2* ou ses mutants. Les différentes formes du plasmide sont séparées sur gel d'agarose. L'intensité des bandes est mesurée par Image J. L'intensité des bandes « réparées » est normalisé par l'intensité de la bande du plasmide linéaire puis le résultat obtenu pour le vecteur vide est rapporté à 1 (C).

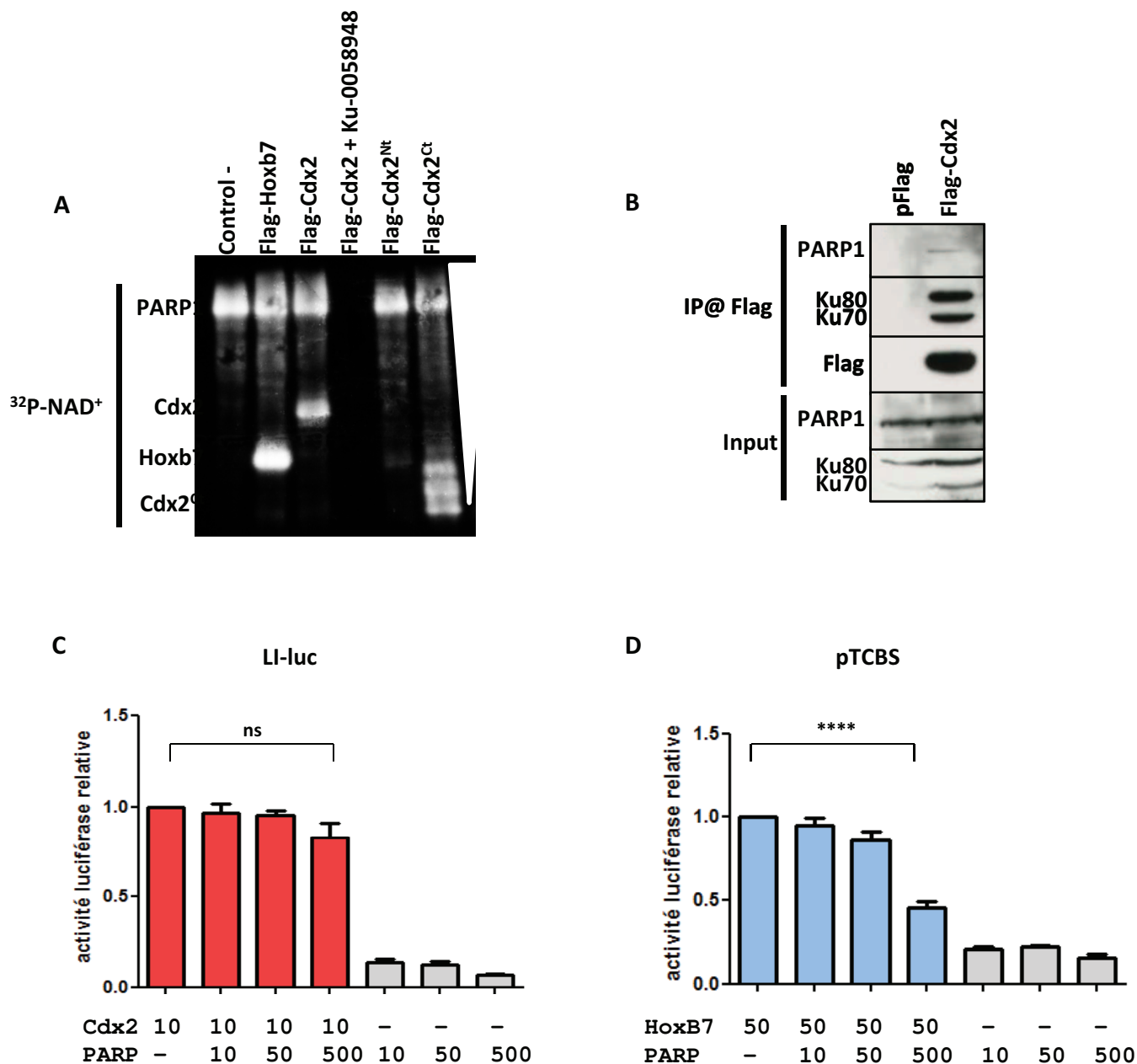
des cassures de l'ADN (Fig. 47B, C). Le statut de phosphorylation de ce motif n'a donc pas d'effet sur l'interaction de CDX2 avec KU70/80 ni sur l'activité inhibitrice de CDX2 sur le NHEJ.

## b. L'ADP-ribosylation

L'ADP-ribosylation est une modification post-traductionnelle des protéines consistant en la catalyse d'un ADP-ribose, sur un acide aminé tel que l'acide glutamique, aspartique ou la lysine, à partir du  $\text{NAD}^+$  via PARP. De nombreux facteurs de transcription sont ADP-ribosylés, parmi lesquels HOXB7. PARP1 et HOXB7 appartiennent à un même complexe protéique et cette interaction permet l'ajout de polymères d'ADP-ribose sur HOXB7 au niveau d'une région riche en acide glutamique située dans sa partie C-terminale, ayant pour conséquence une inhibition de son activité transcriptionnelle (Wu et al., 2012).

Nous nous sommes posés deux questions : l'ADP-ribosylation de HOXB7 a-t-elle un impact sur la réparation de l'ADN ? A l'instar de HOXB7, la protéine CDX2 est-elle ADP-ribosylée ?

Afin de confirmer l'ADP-ribosylation de la protéine HOXB7 et de tester l'ADP-ribosylation de CDX2 par PARP1, les deux protéines, surexprimées dans les cellules cancéreuses coliques HCT116, ont été immunoprécipitées puis soumises à un test *in vitro* d'ADP-ribosylation en présence de PARP1 et de  $\text{NAD}^+$  radioactif (expériences réalisées au laboratoire de F. Dantzer). Ce test d'ADP-ribosylation *in vitro* a permis non seulement de confirmer l'ADP-ribosylation de HOXB7 mais également de mettre en évidence une nouvelle modification post-traductionnelle de CDX2 : en effet, CDX2 est ADP-ribosylée par PARP1, majoritairement au niveau de sa partie C-terminale (Fig. 48A). De plus, j'ai mis en évidence, par co-immunoprécipitation, la présence d'une interaction entre PARP1 endogène et CDX2 dans la lignée cancéreuse colique HCT116 (Fig. 48B). Nous avons ensuite cherché à établir les conséquences fonctionnelles de l'ADP-ribosylation des protéines CDX2 et HOXB7 sur leur activité transcriptionnelle et sur leur activité de contrôle de la réparation de l'ADN. La surexpression de *Parp1*, dans les cellules HCT116, en combinaison avec *Cdx2*, n'entraîne pas de modification significative de l'activité transcriptionnelle de CDX2 (co-transfection avec le vecteur rapporteur CDH17-Luc) ni de l'activité inhibitrice de CDX2 sur la religation du plasmide pGI3-contrôle linéarisé (Fig. 49A). En revanche, parallèlement à la réduction de l'activité transcriptionnelle de HOXB7 mesurée à l'aide du plasmide rapporteur pTCBS, PARP1 réduit l'effet stimulateur de HOXB7 sur la réparation de l'ADN dans le test de réparation *in vivo* (Fig. 49B). Ces résultats sont confirmés par un test de réparation *in vitro* dans lequel des extraits nucléaires de cellules contrôle ou surexprimant



**Figure 48. ADP-ribosylation de CDX2 et HOXB7.**

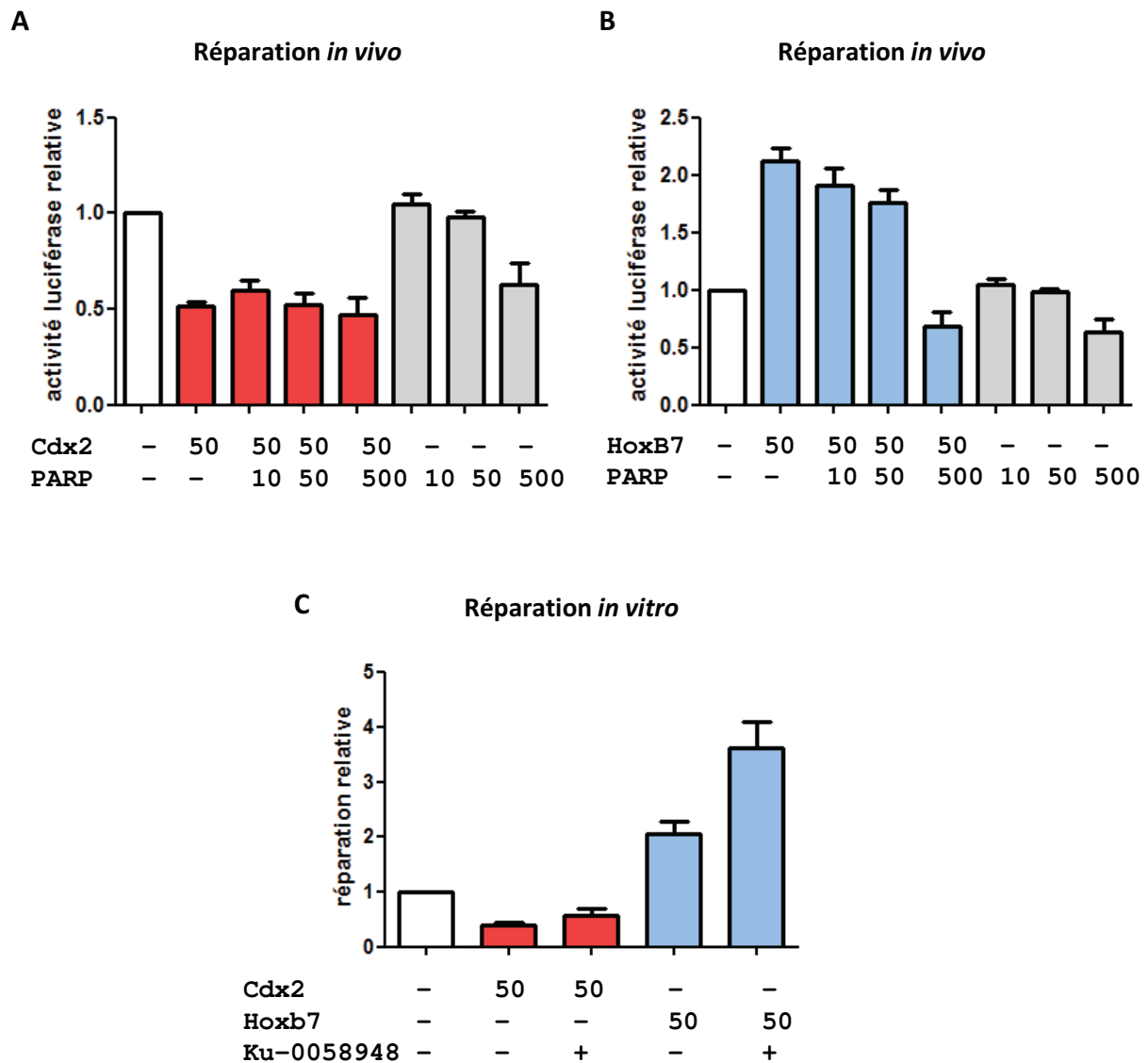
Les cellules HCT116 sont transfectées puis un mg de protéines sont immunoprécipitées avec un anticorps anti-Flag. Les protéines précipitées sont mises en présence de PARP1 et de NAD<sup>+</sup> radioactif. L'ajout d'ADP-ribose par PARP1 sur les protéines cibles est révélé par Western blot en mesurant la radioactivité. Quand cela est indiqué, les cellules sont traitées 2h avant la lyse et pendant l'immunoprécipitation par 100nM de Ku-0058948 (inhibiteur de PARP1) (A). Immunoprécipitation de Flag-Cdx2 et du vecteur vide par l'anti-Flag. Le Western blot est révélé par les anticorps anti-Flag, anti-KU70/80 et anti-PARP1 (Abcam) (B). L'activité transcriptionnelle de CDX2 est mesurée par luciférase sur le promoteur de la LI-cadhérine (C) et celle de HOXB7 sur le pTCBS (D). Les cellules HCT116 sont transfectées avec une combinaison de *Cdx2/Hoxb7* et de doses croissantes de *Parp1*. Les valeurs sont normalisées par le contrôle interne, la luciférase Rénilla, puis l'activité pour CDX2 ou HOXB7 est rapportée à 1. (ns : différences non-significative  $P > 0,05$ ), (\*\*\*\*  $P < 0,0001$ ).

HOXB7, sont traités avec un inhibiteur de PARP1. Ce dernier, en empêchant l'ADP-ribosylation de HOXB7 permet d'accroître son effet stimulateur sur la réparation (Fig. 49C). Une légère inhibition significative de la réparation est observée en présence de 500ng de PARP1 seule. Ceci peut être la conséquence d'inhibition de protéines endogènes impliquées dans la réparation, telle que HOXB7 étant donné que son gène est fortement exprimé dans les HCT116 et que son activité sur la réparation est inhibée par PARP1.

En conclusion, CDX2, tout comme HOXB7 peut être ADP-ribosylée par la PARP1. Cependant, cette modification ne module ni son activité transcriptionnelle ni son effet inhibiteur de la réparation de l'ADN. Aucune conséquence fonctionnelle de cette modification n'a pour l'heure été déterminée. Pour HOXB7, les résultats montrent que son ADP-ribosylation inhibe son activité transcriptionnelle et son effet stimulateur sur la réparation, suggérant encore une fois que l'action de HOXB7 sur la réparation passe par son activité transcriptionnelle.

### C. L'héxapeptide

Certaines protéines homéotiques possèdent un site d'interaction avec les protéines PBX. Pour HOXB7, cette séquence constitue un héxapeptide (IYPWMR) dont la mutation de la méthionine et du tryptophane abolit l'interaction avec PBX (Chang et al., 1995; Yaron et al., 2001). L'interaction entre HOXB7 et PBX modifie leur affinité pour l'ADN et également leurs gènes cibles. PBX accentue le pouvoir oncogénique de *Hoxb7* en favorisant l'inhibition de la différenciation des myéломocytes et de l'apoptose (Errico et al., 2013). Dans le cas de CDX2, la séquence de l'héxapeptide n'est que partiellement conservée (LCEWMR). Cependant, les acides aminés W et M sont présents. La mutation du tryptophane en alanine ne modifie pas le pouvoir transformant de CDX2 dans la lignée hématopoïétique (Rawat et al., 2008). Etant donné le rôle de l'interaction PBX/ HOXB7, nous nous sommes demandés si elle avait une fonction dans l'effet stimulateur de la réparation de HOXB7. J'ai donc muté les tryptophanes et méthionines de CDX2 et HOXB7 en alanine et j'ai également transformé l'héxapeptide de CDX2 en celui de HOXB7 et inversement (Fig. 57 du Matériels et Méthodes). La mutation de l'héxapeptide de HOXB7 ou de CDX2 n'interfère pas dans l'interaction de ces homéoprotéines avec KU70/80 (Fig. 50A). Elle ne modifie pas non plus l'activité transcriptionnelle de CDX2 et HOXB7 sur leur vecteur rapporteur respectif (LI-luc et pTCBS) (Fig. 50B). De manière très intéressante, la mutation des acides aminés W et M de CDX2 entraîne une perte de l'inhibition de la réparation alors que le changement complet de l'héxapeptide de CDX2 en celui de HOXB7 conduit à



**Figure 49. Impact de l'ADP-ribosylation sur l'activité de réparation de CDX2 et HOXB7.**

Les cellules HCT116 sont transfectées avec une combinaison de *Cdx2/Hoxb7* (50ng) et de doses croissantes de *Parp1* (10, 50 et 500ng). Quand indiqué, les cellules sont traitées 2h avant la lyse par 100nM de Ku-0058948 (inhibiteur de PARP1). L'activité de réparation *in vivo*, de CDX2 (A) et de HOXB7 (B) est quantifiée en mesurant l'activité du rapporteur luciférase pGL3-contrôle préalablement linéarisé par HindIII. Les valeurs sont normalisées par la Rénilla puis celle du vecteur vide est rapportée à 1. La réparation *in vitro* est évaluée grâce à l'apparition de multimères à partir d'un plasmide linéaire, les différentes formes du plasmide sont séparées sur gel d'agarose puis l'intensité des bandes est quantifiée à l'aide d'Image J. L'intensité des monomères et multimères est normalisée par celle du linéaire et le vecteur vide est rapportée à 1 (C).

une stimulation de la réparation (Fig. 50C). En revanche, la mutation de l'héxapeptide de HOXB7 ne modifie pas son action stimulatrice sur la réparation.

Ces résultats sont préliminaires et ne permettent pas de tirer des conclusions définitives. Il serait intéressant de réaliser des expériences de co-immunoprécipitation afin de déterminer avec quel membre de la famille TALE (PBX, Meis) les protéines CDX2 et HOXB7 peuvent interagir et si les mutations, décrites plus haut, entraînent un changement de partenaire qui pourrait expliquer les actions opposées de CDX2 et HOXB7 sur la réparation de l'ADN. L'invalidation spécifique par des siARNs spécifiques de ces partenaires permettrait de confirmer cette hypothèse.

#### D. Les mutants chimériques

Des mutants chimériques ont été construits dans le but de déterminer quelles parties des protéines CDX2 et HOXB7 sont indispensables à leur activité sur la réparation des cassures de l'ADN.

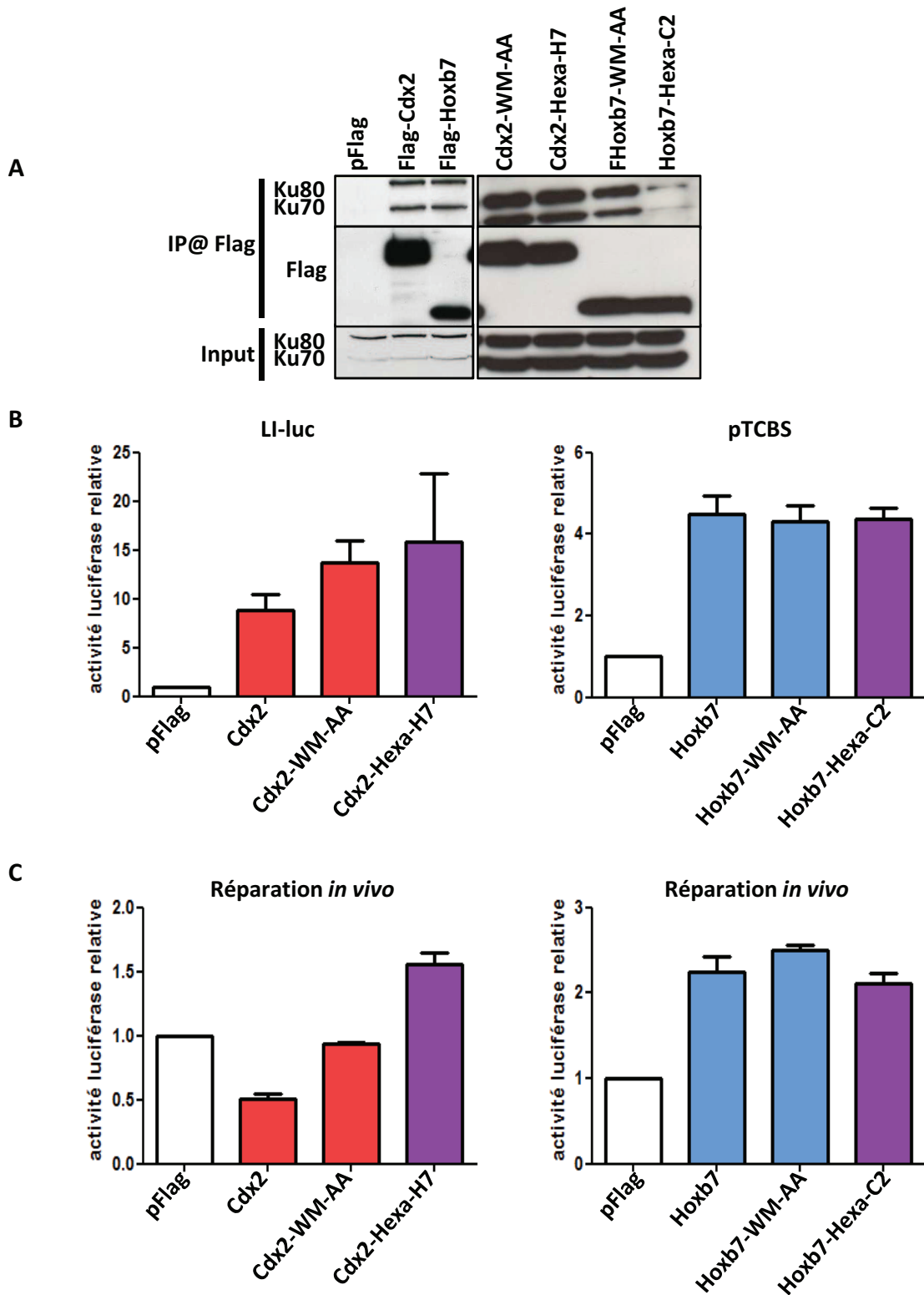
Ces mutants sont formés par la combinaison des différents domaines (domaine de transactivation, homéodomaine, partie C-terminale) de CDX2 et HOXB7 (Fig. 55 Matériels et Méthodes).

Les principaux résultats et les conclusions qui en résultent sont présentés dans l'article. Ces résultats sont repris dans cette partie, complétés par d'autres mutants chimériques de CDX2 et HOXB7.

Dans un premier temps, j'ai vérifié que ces mutants ne perdent pas leur capacité à interagir avec KU70/80, par co-immunoprécipitation (Fig. 51A) ni à se fixer sur l'ADN ni à activer leurs gènes cibles par des tests de co-transfection avec leur vecteur rapporteur luciférase SI-luc (promoteur de la Saccharase Isomaltase) pour CDX2 et pTCBS pour HOXB7 (Fig. 51B, C).

Ces résultats montrent que l'activité transcriptionnelle des mutants chimériques, sur la cible correspondant à leur homéodomaine, est conservée et donc leur capacité à se fixer à l'ADN de même que celle à activer la transcription par le domaine de transactivation présent. La partie C-terminale de CDX2 en association avec son homéodomaine est nécessaire pour activer la transcription de sa cible.

J'ai, par la suite, testé l'ensemble de ces mutants pour leur capacité à réguler la réparation d'un plasmide linéarisé *in vitro* (Fig. 51D) et *in vivo* (Fig. 51E). Les résultats sont résumés dans le



**Figure 50. Rôle du domaine d'interaction avec PBX de CDX2 et HOXB7 sur la réparation de l'ADN.**

L'héxapeptide de CDX2 et HOXB7 est une zone d'interaction avec PBX. La mutation des acides aminés WM en alanines abolit cette interaction (WM-AA). L'héxapeptide de CDX2 est transformé en celui de HOXB7 (Cdx2-Hexa-H7) et inversement (Hoxb7-Hexa-C2). Les cellules HCT116 sont transfectées avec le vecteur pFlag, Flag-Cdx2, Flag-Hoxb7 et les différents mutants. Un mg de protéines sont immunoprécipitées avec un anticorps anti-Flag puis révélées par Western blot avec les anticorps anti-Flag et anti-KU70/80 (A). L'activité transcriptionnelle des mutants est évaluée par luciférase sur le promoteur de la LI-cadhérine pour CDX2 et sur le pTCBS pour HOXB7 (B). L'activité de réparation *in vivo* des mutants est évaluée en mesurant l'activité de la luciférase du vecteur linéarisé pGI3-contrôle (C). Les valeurs sont normalisées par le contrôle interne, la luciférase Rénilla, puis l'activité pour le vecteur vide est rapportée à 1.

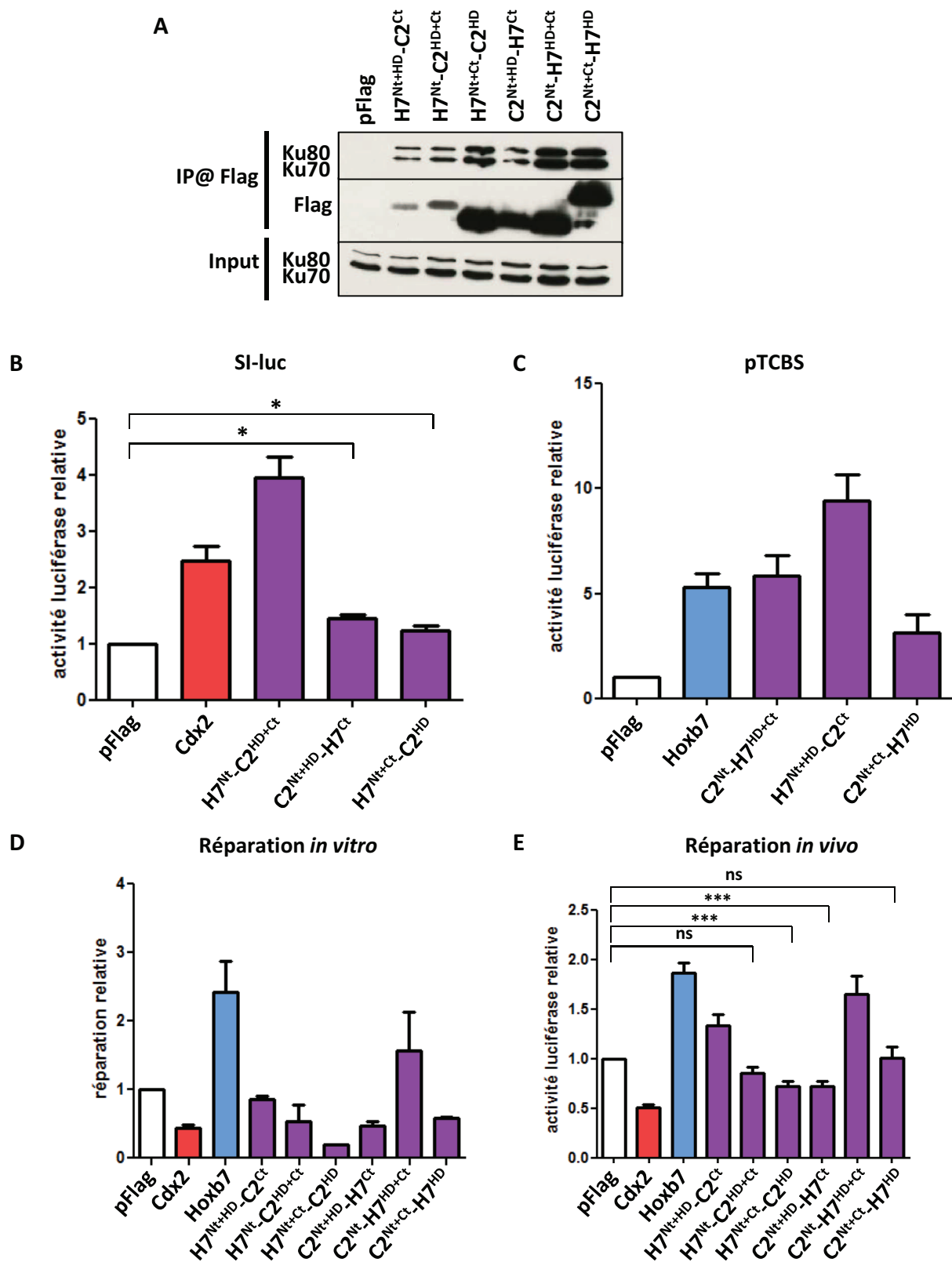
tableau ci-dessous. Les résultats obtenus avec les mutants de délétion et de l'héxapeptide sont également présentés dans ce tableau afin de regrouper l'ensemble des données :

Mutant	TAD	Hexa	HD	Ct	<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>
F-Cdx2	✓	✓	✓	✓	---	---
F-Hoxb7	✓	✓	✓	✓	+++	+++
F-B7 <sup>Nt+HD</sup> C2 <sup>Ct</sup>	HOXB7	HOXB7	HOXB7	CDX2	+	-
F-C2 <sup>Nt+HD</sup> B7 <sup>Ct</sup>	CDX2	CDX2	CDX2	HOXB7	--	---
F-B7 <sup>Nt</sup> C2 <sup>HD+Ct</sup>	HOXB7	HOXB7	CDX2	CDX2	0	--
F-C2 <sup>Nt</sup> B7 <sup>HD+Ct</sup>	CDX2	CDX2	HOXB7	HOXB7	+	++
F-B7 <sup>Nt+Ct</sup> C2 <sup>HD</sup>	HOXB7	HOXB7	CDX2	HOXB7	0	--
F-C2 <sup>Nt+Ct</sup> B7 <sup>HD</sup>	CDX2	CDX2	HOXB7	CDX2	--	--
F-C2 <sup>Nt</sup>	✓	✓	tronqué	-	+	0
F-C2 <sup>HD+Ct</sup>	-	-	✓	✓	---	---
F-C2 <sup>HD</sup>	-	-	✓	-	0	0
F-H7 <sup>Nt</sup>	✓	✓	tronqué	-	0	0
F-H7 <sup>HD+Ct</sup>	-	-	✓	✓	0	0
F-H7 <sup>HD</sup>	-	-	✓	-	0	0
F-C2-WM-AA	✓	AA	✓	✓	0	/
F-H7-WM-AA	✓	AA	✓	✓	+++	/
F-C2-Hexa-H7	✓	HOXB7	✓	✓	++	/
F-H7-Hexa-C2	✓	CDX2	✓	✓	+++	/

+ : stimulation de la réparation  
 - : inhibition de la réparation  
 0 : pas d'effet significatif  
 / : non-testé

En résumé, HOXB7 requiert son domaine de transactivation pour stimuler la réparation de l'ADN, contrairement à CDX2. Ceci suggère que HOXB7 agit sur la réparation de manière transcriptionnelle. A l'inverse CDX2 ne nécessite pas la présence de son domaine de transcription et





**Figure 51. Les mutants chimériques de CDX2 et HOXB7.**

Les cellules HCT116 sont transfectées avec les différents mutants chimériques. L'interaction avec KU70/80 est mise en évidence par co-immunoprécipitation des différents mutants flagués (A). L'activité transcriptionnelle des mutants possédant l'homéodomaine de CDX2 est mesurée sur le promoteur de la SI (B), ceux ayant l'homéodomaine de HOXB7 sur le pTCBS (C). L'activité de la luciférase est normalisée par la Rénilla puis l'activité pour le vecteur vide est rapporté à 1. L'activité de réparation des mutants est mesurée *in vitro* (D) et *in vivo* (E). (\*  $P < 0,05$  ; \*\*\*  $P < 0,005$ ), (ns : différences non-significative  $P > 0,05$ ).

inhibe la réparation de manière non-transcriptionnelle. La partie C-terminale de CDX2 semble également jouer un rôle dans l'inhibition du NHEJ.

## 5. Conclusion

HOXB7 et CDX2 sont deux protéines à homéodomaine exprimées dans l'épithélium intestinal. *Cdx2* est exprimé plus fortement que *Hoxb7*, son expression est réduite lors de la tumorigenèse colique et il exerce une fonction suppresseur de tumeur. *Hoxb7*, à l'inverse, a une fonction oncogénique et voit son expression augmentée dans le développement tumoral.

HOXB7 et CDX2, bien qu'interagissant toutes deux avec les protéines KU70/80, n'ont pas la même action sur le système de réparation NHEJ. En effet, alors que CDX2 exerce un effet inhibiteur sur le NHEJ, HOXB7 le stimule.

L'utilisation de mutants chimériques et de délétion ont permis de mettre en évidence un mécanisme d'action différent pour chacune des protéines. Alors que HOXB7 requiert son domaine de transactivation pour stimuler la réparation, CDX2 ne le nécessite pas. La partie C-terminale de CDX2 joue également un rôle dans la fonction inhibitrice de la protéine.

L'analyse de certaines modifications post-traductionnelles a permis de montrer que le statut de phosphorylation de CDX2 au niveau de sa partie C-terminale n'influence pas son action sur le NHEJ. Une ADP-ribosylation de CDX2 a également été mise en évidence et été confirmée pour HOXB7. L'ADP-ribosylation de HOXB7 a pour conséquence d'inhiber sa fonction transcriptionnelle et, par conséquent, contrecarre son effet stimulateur sur la réparation. En revanche aucun rôle de l'ADP-ribosylation n'a pu être mis en évidence pour CDX2, pour l'instant.

Les derniers résultats obtenus ouvrent une nouvelle possibilité d'explication quant aux mécanismes d'action de CDX2 et HOXB7. En effet, des mutations affectant le site de fixation pour PBX de CDX2 et HOXB7 entraînent des modifications de leur activité sur la réparation de l'ADN. Le changement de l'héxapeptide de CDX2 en celui de HOXB7 conduit à un passage d'une action inhibitrice à stimulatrice. A l'inverse, la perte de ce site, n'entraîne pas de perte de la stimulation par HOXB7. En conclusion, ce site, et en l'occurrence une potentielle interaction avec un PBX, semble pouvoir moduler, en partie (le mutant F-C2<sup>HD+Ct</sup> ne possédant pas l'héxapeptide, reste inhibiteur) l'activité réparatrice de CDX2. Des expériences complémentaires devront être réalisées afin de valider cette hypothèse.

Quant aux résultats obtenus avec les mutants ponctuels, notamment le mutant CDX2 R237P, ils démontrent non seulement l'importance de la séquence protéique mais également de sa structure tridimensionnelle pour ses interactions et fonctions, puisque l'insertion d'un coude dans la protéine CDX2 ou HOXB7 via le changement d'un acide aminé en proline entraîne une perte de l'interaction avec KU70/80. Cependant, le fait que la mutation R237P de CDX2 transforme la protéine d'un inhibiteur à un stimulateur reste curieux. Cette mutation n'a jamais été décrite chez l'homme, ce qui suggère qu'elle pourrait avoir un effet délétère majeur, incompatible avec la vie dès le stade embryonnaire.

En conclusion, deux protéines appartenant à la même famille peuvent avoir deux fonctions cellulaires opposées par des mécanismes différents.

## Chapitre III : *Le variant d'épissage de Cdx2 : miniCdx2*

Vanier, M., Balbinot, C., Soret, C., Martin, M., Saandi, T., Robine, S., Domon-Dell, C., Reimund, J-M., Launay, J-F., Deschamps, J., Beck, F., Gross I., Duluc, I., Freund J-N. A Splice Variant Modulates the Transcriptional and Non-transcriptional Function of Homeoprotein CDX2. Manuscript soumis à *Gut*.

### 1. Le variant d'épissage *miniCdx2*

Au laboratoire, un variant d'épissage du gène *Cdx2* a été mis en évidence et nommé *miniCdx2*. L'ARN messager de *Cdx2* possède un second codon d'initiation de la traduction en amont de celui classiquement utilisé pour générer la protéine CDX2. La traduction à partir de ce premier ATG, associé à l'épissage au niveau d'un site donneur d'épissage chevauchant le deuxième ATG engendre la traduction d'un variant de CDX2, miniCDX2, dont le domaine de transactivation est remplacé par 12 acides aminés. MiniCDX2 est exprimée au niveau de la base des cryptes de l'épithélium intestinal et tout comme *Cdx2* son expression est altérée lors du développement tumoral.

### 2. Le rôle de *miniCdx2*

Le but de ce travail était d'analyser la fonctionnalité de ce variant d'épissage au sein de l'épithélium intestinal en réalisant une étude comparative entre *Cdx2* et *miniCdx2* sur les différentes activités transcriptionnelles et non-transcriptionnelles de CDX2.

Nous avons montré que :

- **la surexpression de miniCdx2 dans l'épithélium du duodénum perturbe le développement des glandes de Brunner.**
- **miniCDX2 exerce un effet dominant-négatif sur l'activité transcriptionnelle de CDX2.**
- **miniCDX2, contrairement à Cdx2, ne peut interagir avec la  $\beta$ -caténine et n'exerce donc aucun rôle sur la voie Wnt.**
- **miniCDX2 intervient également dans la stabilisation de la protéine p27<sup>Kip1</sup>.**

- **miniCDX2, comme CDX2, interagit avec KU70/80 et inhibe la réparation des cassures double-brins de l'ADN par le mécanisme du NHEJ.** Cette partie constitue ma contribution à ce travail.

# **A Splice and Translation Variant Modulates the Transcriptional and Non-Transcriptional Functions of Homeoprotein CDX2**

**Marie Vanier<sup>1,2</sup>, Camille Balbinot<sup>1,2</sup>, Christine Soret<sup>1,2</sup>, Elisabeth Martin<sup>1,2</sup>,  
Thoueiba Saandi<sup>1,2</sup>, Sylvie Robine<sup>3,4</sup>, Claire Domon-Dell<sup>1,2</sup>, Jean-Marie Reimund<sup>1,2</sup>,  
Jean-François Launay<sup>1,2</sup>, Jacqueline Deschamps<sup>5,6</sup>, Felix Beck<sup>7</sup>, Isabelle Gross<sup>1,2</sup>,  
Isabelle Duluc<sup>1,2,8</sup>, Jean-Noël Freund<sup>1,2,8</sup>**

<sup>1</sup> INSERM, UMR\_S1113, 3 avenue Molière, 67200 Strasbourg, France

<sup>2</sup> Université de Strasbourg, Faculté de Médecine, FMTS, 67081 Strasbourg, France

<sup>3</sup> CNRS, UMR 144, Paris Cedex 05, 75248 France

<sup>4</sup> Institut Curie, Paris Cedex 05, 75248 France

<sup>5</sup> Hubrecht Institute, Developmental Biology and Stem Cell Research, Uppsalalaan 8, 3584 CT Utrecht, The Netherlands

<sup>6</sup> University Medical Center Utrecht, 3584 CX Utrecht, The Netherlands

<sup>7</sup> Barts and The London School of Medicine and Dentistry, London E1 2ES UK

<sup>8</sup> These authors contributed equally.

## **Address for correspondence:**

Dr. Jean-Noël Freund

INSERM UMR\_S1113, 3 Avenue Molière, 67200 Strasbourg,  
France

Tel: (+33) 388 27 77 27; Fax (+33) 388 26 35 38

Email: [jean-noel.freund@inserm.fr](mailto:jean-noel.freund@inserm.fr)

**Keywords:** homeobox gene, RNA processing, foregut-type differentiation, dysplasia, transgenic model

## ABSTRACT

**Objective.** The homeobox gene *CDX2* is central for intestinal development and homeostasis but its regulation remains poorly understood. Here we investigated alternative splicing, a common mechanism of gene regulation and generation of protein diversity.

**Design.** RNA probes and an antibody were developed to identify a variant of *CDX2* mRNA and protein in the gut. Functional studies of this variant were performed in cell lines and in the gut epithelium of transgenic mice.

**Results.** Based on phylogenetic considerations, we identified a variant, mini*CDX2*, generated by alternative splicing and translation initiation, containing the DNA-binding homeodomain but devoid of the transactivation domain. This variant is preferentially expressed in intestinal crypts, including stem cells, in contrast to *CDX2* expressed in crypt and villus cells.

Mini*CDX2* differentially modulates the transcriptional and non-transcriptional functions of *CDX2*. In vivo, its overexpression in the gut epithelium mimics *CDX2* deficiency, indicating a role in restraining the biological function of *CDX2* to the appropriate level in crypt cells.

Overexpression in Brunner's glands increased PDX1 levels leading to their expansion and ultimately to non-cancerous lesions with gastric-type and squamous stratified epithelium, suggesting that mini*CDX2* is a new factor in shaping of the gastric-intestinal boundary.

**Conclusion.** These results reveal that *CDX2* is regulated at the posttranscriptional level by alternative splicing and translation to produce a variant that differentially modulates the multiple functions of the full-length protein. This study highlights the importance of generating protein diversity through alternative splicing for the control of homeostasis of the constantly renewed epithelium of the gastrointestinal tract.

## **Significance of this study**

### **What is already known about this subject?**

- The intestine-specific homeobox gene *CDX2* is central to determine and maintain the identity and control the homeostasis of the continuously-renewed gut epithelium.
- *CDX2* is regulated at the transcriptional (gene promoter activity) and posttranslational levels (protein phosphorylation and ubiquitination).
- The *CDX2* transcription factor acts through transcription-dependent and transcription-independent mechanisms.

### **What are the new findings?**

- We identify a splice and translation variant, mini*CDX2*, containing the DNA binding domain but devoid of transactivation domain.
- Mini*CDX2* exhibits a different profile than *CDX2*, being predominantly expressed at the crypt base.
- Mechanistically, mini*CDX2* differentially modulates the transcription-dependent and transcription-independent activity of *CDX2*.
- In vivo, mini*CDX2* attenuates the differentiation activity of *CDX2*, and represents a new factor in shaping of the gastric-intestinal boundary.

### **How might it impact on clinical practice in the foreseeable future?**

- The *CDX2* biological activity is not directly proportional to the level of *CDX2* protein.
- Mini*CDX2* expression might be evaluated in pathology: cancers and inflammatory diseases.



## INTRODUCTION

Homeobox genes encode crucial developmental transcription factors. Among them, *CDX2* exerts broad functions during embryogenesis [1] especially for intestinal determination [2,3]. Beyond embryogenesis, *CDX2* is specific of the gut throughout adulthood where it is central for homeostasis of the continuously renewed intestinal epithelium. Indeed, complete intestinal knockout compromises the gut function leading to death, while overexpression is also lethal due to excessive maturation [4-6]. This indicates that the complex role of *CDX2* on both cell proliferation and differentiation [7,8] needs to be tightly regulated. *CDX2* is also involved in pathology. Colon tumors with a strong reduction of *CDX2* are of poor prognosis [9] and functional studies suggest a tumor suppressor role in the gut [10,11]. Inversely, *CDX2* can be abnormally expressed outside the gut and this ectopic expression associates with precancerous metaplastic lesions [12,13] and leukemia [14].

Here, we identified a short phylogenetically-conserved motif in *CDX2*, related to the production of a variant by alternative splicing and alternative translation initiation. Functional studies of this variant reveal a new and original mechanism of regulation of *CDX2* activity, highlighting the relevance of generating protein diversity to properly control intestinal homeostasis.

## RESULTS

### **An evolutionary-conserved and translational-active start codon upstream of the CDX2 start site**

Comparison of 40 *CDX* sequences (Fig S1) revealed a motif in *CDX2* genes, conserved from coelacanth to human, made of one out-of-frame ATG (referred to as ATG<sub>1</sub>) 29 or 26 bp upstream of the ATG used for CDX2 protein translation (referred to as ATG<sub>2</sub>), one stop codon (Stop1) in frame with ATG<sub>1</sub> located 4 bp downstream of ATG<sub>2</sub> and one T nucleotide following ATG<sub>2</sub> (Fig 1A).

We studied the translation-competence of this upstream out-of-frame ATG<sub>1</sub> and compared it to ATG<sub>2</sub>. The translation activity of the CDX2 start codon AUG<sub>2</sub> was demonstrated using the luciferase plasmid pATG1-ATG2 containing the 5'-untranslated region of the mouse *Cdx2* gene up to ATG<sub>2</sub> (Fig 1Ba). Strikingly, pATG1 ending at ATG<sub>1</sub> produced an even higher luciferase activity; this activity was abolished by ATG<sub>1</sub> mutation in pATG1m, and destroying ATG<sub>1</sub> in pATG1m-ATG2 increased luciferase compared to pATG1-ATG2 (Fig 1Ba). Thus, AUG<sub>2</sub> used for CDX2 translation is preceded by the out-of-frame and translation-competent codon AUG<sub>1</sub>.

While ribosomes generally start translation at the first AUG after cap-dependent scanning of the 5'-untranslated region, they can skip it for a second site by leaky scanning [15] or reach an internal codon using a cap-independent Internal Ribosome Entry Site [16]. To compare the cap-dependency of AUG<sub>1</sub> and AUG<sub>2</sub>, uncapped and m7G-capped reporter RNAs named RNA<sub>AUG1</sub> and RNA<sub>AUG1-AUG2</sub> were *in vitro* transcribed from PCR templates deriving from pATG1 and pATG1-ATG2. After RNA transfection (Fig 1Bb), luciferase was higher for capped *vs* uncapped RNA<sub>AUG1</sub>, as well as for capped *vs* uncapped RNA<sub>AUG1-AUG2</sub>; destroying AUG<sub>1</sub> in RNA<sub>AUG1m-AUG2</sub> increased luciferase compared to RNA<sub>AUG1-AUG2</sub>. Thus, AUG<sub>1</sub> is an active start codon located upstream of and out-of-frame with the CDX2 AUG<sub>2</sub>, the latter being reached by ribosomes by leaky scanning through AUG<sub>1</sub>.

### **A splice variant translated from AUG<sub>1</sub> into miniCDX2**

The conserved T following ATG<sub>2</sub> forms a putative GT splicing donor site which, combined with the acceptor site of Intron-1, would destroy AUG<sub>2</sub> and place AUG<sub>1</sub> in frame with the coding sequence of Exons-2/-3 (Fig 1C; Fig S2). RT-PCR using primers located upstream of ATG<sub>1</sub> in Exon-1 and downstream of Stop2 in Exon-3 revealed two bands from RNA of

human colon cancer cells Caco2TC7, SW480 and T84 (Fig 1D): the one corresponds to the *CDX2* mRNA, and the second represents an alternatively spliced transcript joining the AT of  $ATG_2$  to Exon-2, as assessed by sequence determination (referred thereafter to as *miniCDX2*, Fig S2). Northern blots with Caco2TC7 polyadenylated RNA confirmed the existence of the *miniCdx2* mRNA, which was more than 15-times less abundant than the *CDX2* transcript (Fig 1E). In mice too, the *miniCdx2* mRNA was expressed at a 5- to 20-times lower level than the *CDX2* mRNA along the gut (Fig 1F).

The alternatively-spliced RNA is predicted to encode a protein variant, miniCDX2, in which a 12-aa segment replaces the 181-aa transactivation domain of CDX2 (Fig 1G, Fig S2). We raised an antibody (C2T) against this 12-aa segment and validated it using expression plasmids, peptide competition and knockout mice (Fig S3A-C). C2T failed to detect any protein in E11 and E17 mouse embryos. Immunostaining appeared postnatally in the intervillous epithelium of the small intestine and at the bottom of colon glands, and increased in suckling (Fig S3D). It remained in adult animals (Fig 1H), being confined to the crypt epithelium including Lgr5+ Crypt Base Columnar cells and Paneth cells (Fig S3E, F).

### **Divergent and similar functions of miniCDX2 compared to CDX2**

CDX2 is primarily a transcription factor that activates the promoter and mRNA expression of typical targets like Sucrase (SI). MiniCDX2 failed to stimulate Sucrase, but dose-dependently abolished the stimulation by CDX2 (Fig 2Aa,b). It exhibited to capacity to bind the same chromatin targets as CDX2, the Sucrase, Li-cadherin and Muc2 promoters (Fig 2Ac), and reduced the binding of CDX2 to the Sucrase promoter (Fig 2Ad). Thus, miniCDX2 is transcriptionally inefficient but dominant-negative by competing with CDX2 for DNA binding. Beyond regulating transcription through direct DNA binding, CDX2 exerts broader functions. It can bind to  $\beta$ -catenin to prevent the interaction with Tcf4 [17], thus opposing the stimulation of the *Mmp7* mRNA and TOP-Flash reporter (Fig 2Ba,b). MiniCDX2 was without effect on *Mmp7* mRNA and TOP-Flash activity, but unlike its dominant-negative role on the CDX2 transactivation function, it failed to interact with  $\beta$ -catenin and hence to relieve the CDX2 inhibitory effect on  $\beta$ -catenin/Tcf4 (Fig 2Bc,d). Thus, miniCDX2 is neutral with respect to the inhibitory function of CDX2 on  $\beta$ -catenin/Tcf4. CDX2 also exerts transactivation-independent functions including the increase of P27KIP1 to compromise cell proliferation [18]. Like CDX2, miniCDX2 increased the level of P27KIP1 protein without

changing its mRNA (Fig 2Ca,b) and reduced colony formation (Fig 2Cc). We also recently reported that CDX2 inhibits NHEJ activity in colon cancer HCT116 cells by interacting with the KU70/80 complex [19]. Here, we extended these observations by showing that miniCDX2 like CDX2 interacts with KU70/80 in SW480 cells and hampered DNA repair in a standard *in vitro* assay (Fig 2Da,b). Thus, miniCDX2 is a subtle modulator of the multiple molecular functions of CDX2: it is dominant-negative on the primary transactivation function of CDX2, it is neutral on its inhibitory role of  $\beta$ -catenin/Tcf4, and it exerts similar non-transcriptional effects on cell growth inhibition by P27KIP1 and NHEJ DNA repair through KU70/80.

### **Intestinal homeostasis controlled by miniCDX2**

Next, we developed an *in vivo* inducible gain of function model, the *jojo-Flag-miniCDX2* mice (Fig 3A). Crossing them with *Sox2Cre* mice to express miniCDX2 in the epiblast reproduced the embryonic lethality caused by *CDX2* knockout (not shown), demonstrating the functionality of the transgene. In the adult gut (three independent founders), GFP revealed transgene expression only in few villi, leading to Flag-miniCDX2 induction in those villi after crossing with *VilCre* mice. Strikingly, when induction was strong enough, this resulted in the loss of intestinal phosphatase alkaline and ectopic expression of gastric Claudin-18 (Fig 3B), reminiscent of the phenotype of conditional *CDX2*-deficient mice [5]. Thus, miniCDX2 is able to counteract *in vivo* the function of CDX2. Based on this observation, we examined the foregut-type heteroplasia occurring in the cecum of heterozygous *Cdx2*<sup>+/-</sup> mice [2]. As already reported, CDX2 was lost in heteroplastic tissue; however in clear contrast miniCDX2 remained expressed, although heterogeneously (Fig 4C). This prompted us to study the normal gastric mucosa. Despite the absence of CDX2 in the stomach, miniCDX2 was immunodetected at a low level in antral glands (Fig 3Da); the *miniCDX2* transcript was also displayed by RTqPCR, unlike the *CDX2* mRNA, yet at a much lower level (5x) than in the duodenum (Fig 3Db). These results revealed that *CDX2* gene expression, previously thought to be restricted to the intestinal epithelium, extends at a low level more anteriorly in the stomach to produce miniCDX2.

The presence of miniCDX2 overlapping the gastric / intestinal boundary raised the question of whether this variant is involved in patterning this complex structure which also contains the Brunner's glands expressing both CDX2 and miniCDX2 (Fig 4A). The *jojo-Flag-miniCdx2* transgene was broadly expressed in these glands, allowing miniCDX2 overexpression in *jojo-*

*Flag-miniCdx2 // VilCre* mice (Fig 4B). MiniCDX2 overexpression increased PDX1 levels (Fig 4C), the homeobox gene involved in Brunner's glands ontogenesis [20], and accordingly led to a 2.5-fold enlargement of their territory (Fig 4D). Moreover, 50% (10/19) of *jojo-Flag-miniCDX2 // VilCre* mice at ages 1.5-2 years developed 1-2 polyps (Fig 4Ea), in contrast to control *jojo-Flag-miniCDX2* mice (1/12). These polyps exhibited low to high grade dysplasia, without evidence of neoplasia. They were formed by expanded Brunner's glands intermingled with highly proliferative crypts from the overlying duodenal epithelium, while the surface epithelium exhibited areas of gastric-type differentiation expressing Claudin-18 and SOX2, and squamous stratified epithelium expressing P63 and SOX2 (Fig 4Eb). Brunner's glands produce EGF, and deletion of the EGF-R inhibitor Lrig1 in the duodenal epithelium causes adenomas development<sup>21</sup>. RTqPCR revealed a 4 to 18 times higher level of EGF mRNA in the polyps of *jojo-Flag-miniCDX2 // VilCre* mice compared to controls (n=3). Linked to that, the hyper-proliferative crypt area specifically showed elevated levels of phospho-EGF-receptor, as compared to normal duodenal crypts (Fig 4Ec). Thus, overexpression of miniCDX2 results in the PDX1-related expansion of Brunner's glands leading to EGF overproduction and hyperproliferation of the overlaying crypts, ultimately causing abnormal differentiation of the surface epithelium.

## DISCUSSION

Based on phylogenetic comparisons, this study reveals an unexpected posttranscriptional level of regulation of intestinal CDX2 activity through an original mechanism combining alternative splicing and translation, and generating the miniCDX2 variant that modulates the transcription-dependent and -independent activities of CDX2. Alternative splicing is connected to many functions including stem cell maintenance, cell fate determination and also pathologies [22], but it remains largely underrated due to difficulties in evaluating the specific relevance of splice variants beyond predicting their coding sequence. Splicing variants exist for major transcription factors in the gut, i.e. Tcf4, HNF4 $\alpha$  and PPAR $\gamma$ , but these have not been functionally studied as done here for miniCDX2.

CDX2 is constantly required to maintain intestinal identity and differentiation of the adult gut epithelium [4,5], while excessive expression leads to premature crypt cell differentiation and death<sup>6</sup>. This implies the need for a tight regulation of CDX2 activity. In this respect, the variant miniCDX2 present in crypts provides a new mechanism of regulation limiting the

differentiating effect of CDX2 by competing for DNA binding. Thus, it acts in conjunction with protein phosphorylation [23,24] to restrain the overall CDX2 activity at appropriate level in crypt cells. In addition, the increased size of Brunner's glands and the abnormal squamous and gastric-type differentiation linked to PDX1 and SOX2 in miniCDX2-overexpressing mice suggest that this variant constitutes a new factor in the crosstalk between *SOX2*, *PDX1* and *CDX2* genes in shaping the gastric-intestinal boundary. Interestingly, both miniCDX2 overexpression (this study) and long-term CDX2 deficiency [5] produce polyps apparently without criteria of malignancy, at least during the lifespan of mice. The overexpression of miniCDX2 or the loss of CDX2 may not represent oncogenic events *per se*, but the exact pathological relevance of these lesions remains to be established in combination with oncogenic events.

The miniCDX2 variant adds to the complexity of the regulation and function of *CDX2* in the gut in that the CDX2 biological activity is not directly proportional to the level of CDX2 protein. Thus, it will be interesting to evaluate the balance between CDX2 and miniCDX2 in gut pathology. In addition, the different profiles of CDX2 and miniCDX2 along the crypt-villus axis, along the longitudinal axis of the gut and in foregut-type heteroplasia of *Cdx2*<sup>+/-</sup> mice is indicative of a regulated mechanism to generate the two variants, suggesting that the regulation of the splicing machinery likely represents an important aspect of intestinal development and homeostasis. Therefore, this study sheds new light on the relevance of generating protein diversity through alternative splicing and translation, to control homeostasis of the constantly renewed epithelium of the gastrointestinal tract.

### **Acknowledgements**

The Genbank accession number of *miniCDX2* is KJ531444. This work was supported by the INSERM, the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC grants 3759 and 4872). C.B. and C.S. were funded by the MRES, France, and T.S. by the Association for International Cancer Research, UK (AICR, 08-0199). We thank Dr MA Birling (MCI, Illkirch, France) for generating *jojo-Flag-miniCdx2* mice, and Profs MP Chenard (CHU de Strasbourg-Hautepierre) and JF Fléjou (Hôpital Saint-Antoine, Paris) for pathological evaluations.

The authors declare no competing interest.

## MATERIAL AND METHODS

### *Mice*

To generate *jojo-Flag-miniCDX2* transgenics, the Flag-miniCDX2 sequence of plasmid pFlag-miniCDX2 (see below) was PCR amplified with primers containing a SalI site AAAAGTCGACTACCATGGACTACAAAGACGATGA / AAAAGTCGACTCAGCCTGGAATTGCTCTGCCG. The resulting SalI fragment was inserted in XhoI of the vector *jojo* [25] to get plasmid *jojo-Flag-miniCDX2*. The eluted 8,010-bp SalI fragment containing the transgene was injected in mouse eggs at the Mouse Clinic Institute (Illkirch, France). Mice were genotyped with primers 39 / hC2E3R (AGTCATAGCTGTCCCTCTTC / TCAGCCTGGAATTGCTCTGC). *Cdx2*<sup>+/-</sup> [2], *Cdx2*<sup>fllox/fllox</sup>//*AhCre*<sup>ERT</sup> [5], *VilCre* [26] and *Lgr5-Cre*<sup>ERT2</sup>-*IRES-GFP* mice (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) have been described. Mice were housed according to guidelines of the Ethic Committee of the University of Strasbourg.

### *Plasmids*

pFlag-CDX2 and pFlag-miniCDX2. RNA extracted from Caco2-TC7 cells was subjected to RT-PCR using Platinum TaqPCRx DNA polymerase (Promega Inc) with the primers AAAAAAGCTTTACGTGAGCTACCTCCTGGACAAGG and AAAATCTAGATCAGCCTGGAATTGCTCTGC to amplify the human CDX2 coding sequence, and with the primers AAAAAAGCTTGTGAGGTCTGCTCCCGGACCCTCGC and AAAATCTAGATCAGCCTGGAATTGCTCTGC to amplify the miniCDX2 coding sequence. PCR fragments were inserted in pCRII-TOPO (TA cloning kit, Life Technologies Invitrogen, Grand Island, NY), giving respectively pCRII-TOPO-CDX2 and pCRII-TOPO-miniCDX2. These plasmids were cut with HindIII and the fragments inserted in the HindIII site of pFlag-CMV2 (Sigma Aldrich, St Louis, MO) to get the plasmids pFlag-CDX2 and pFlag-miniCDX2, respectively.

pATG1-ATG2 and pATG1m-ATG2. To construct pATG1-ATG2, the 5'-untranslated region of the mouse *Cdx2* gene up to the codon ATG<sub>2</sub> was PCR amplified from pSL1190-9.47 [27] with the TTTTAAGCTTAAGGCCGCTGGCCTGGGACTCCGCGA / TTTTCCATGGTGGCGAGGGACCCAGAGCAGA containing respectively HindIII and NcoI sites. The PCR fragment was cut with HindIII and NcoI and inserted in the corresponding sites of pGI3-control (Promega Inc) to give pATG1-ATG2. pATG1m-ATG2

was derived from pATG1-ATG2 by site directed mutagenesis using the Quick Change IIXL Site Directed Mutagenesis Kit (BD Biosciences, San Rose, CA) with the primer TCAACGTTTGTCCCCAGACACCTAGGTGAGGTCTGCTCTGGGT.

pATG1 and pATG1m. Plasmid pATG1 containing the 5'-untranslated region of the murine *Cdx2* gene up to the codon ATG<sub>1</sub> was constructed as above by PCR amplification with the primers TTTTAAGCTTAAGGCCGCTGGCCTGGGACTCCGCGA and TTTTCCATGGTGTCTGGGGACAAACGTTGT in which the sequence was changed for one nucleotide to create a NcoI cloning site. After insertion of the PCR fragment in the HindIII and NcoI sites of pGl3-control, the correct sequence was restored by point mutagenesis with the primer TTTGTCCCCAGACAGCATGGAAGACGCCAAAAACAT to give pATG1. pATG1m was derived from pATG1 by mutation with the primer TTTGTCCCCAGACACCTAGGAAGACGCCAAAAACAT.

Other plasmids were: pS33A- $\beta$ -catenin encoding activated  $\beta$ -catenin [28], pcDNA3-TCF4E-myc encoding Myc-tagged Tcf4 [29], the reporter plasmids TOPFlash [30] and pSI-Luc [31], and commercially-available pEGFP, pGl3-basic, pGl3-control and pRL-Null (Clontech, Mountain View, CA; Promega Inc., Madison, WI).

### ***Cell lines, plasmids and RNA transfections, luciferase assays, colony formation assays***

Human colon cancer cells Caco2TC7, HCT116, SW480 and T84 [32-35] were grown as recommended. Plasmid transfection was performed during 48 h with JetPEI (Polyplus Transfection, Illkirch, France). RNA transfection was performed for 3h with 100 to 500 ng of in vitro transcribed RNA using 0.25 to 1.25  $\mu$ l TransIT mRNA and 0.375 to 1.875  $\mu$ l of boost (Mirus Bio, Madison, WI) on cells at 80% confluence. Firefly and Renilla luciferase activities were measured at least three times in triplicate using a dual reporter luciferase assay (Promega Inc) in cell extracts prepared 48h after DNA transfection or 3h after RNA transfection. Means are given  $\pm$ SD. Colony formation assays were performed on HCT116 cells transfected with the indicated plasmids, as previously described [24].

### ***Antibodies, immunostaining***

To produce the C2T antibody against miniCDX2, rabbits were immunized with the synthetic peptide MVRSA PGSPSP-Cystein coupled to KLH (Eurogentech SA, Seraing, Belgium). C2T



antibody was purified by affinity chromatography. The peptide was reduced by TCEP (Tris-(2-carboxyethyl) phosphine) using Immobilized TCEP-Disulfide Reducing gel (Pierce Biotechnology, Rockford, IL). 2.5 mg of reduced peptide were incubated with 2 mL sulfonyl-agarose (SulfoLink Trial kit, Pierce Biotechnology) during one hour and the affinity gel was equilibrated in Tris 50 mM / NaCl 0.15 M pH 7.3 buffer. 2 mL of rabbit immune serum were passed through the affinity column, washed with Tris 50 mM / NaCl 0.15 M – 0.5 M pH 7.3. Specific immunoglobulins were eluted with glycine 0.2M pH 2.7 and neutralized with 50 $\mu$ L Tris 1M pH 8 buffer. The C2T antibody was used at 16  $\mu$ g/mL.

Commercial antibodies were for:  $\beta$ -catenin (mouse clone 14, BD Transduction Lab, San Rose, CA), CDX2 (mouse clone 392M, BioGenex, San Ramon, CA), Claudin-18 (Life Technologies Invitrogen), Flag (mouse clone M2, Sigma Aldrich, San Louis, MO), GFP (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ), HA (clone 3F10, Roche Applied Science), KU70 (rabbit clone EPR4027, Abcam, Cambridge, MA), KU80 (rabbit clone EPR3468, Abcam), Myc (mouse clone 9E10, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA), p27KIP1 (mouse clone 57, BD Transduction Lab), PDX1 (rabbit, Abcam ab47267), phospho-EGFR (Cell Signaling Millipore), phospho-Histone-3 (Ser10 mitosis marker, Millipore Upstate). Immunochemical staining and/or immunofluorescence detection were performed on paraffin-embedded tissue sections [27]. Histochemical staining used the Vectastain ABC kit (Vector Labs, Peterborough, UK) and DAB 0.3 mg/mL / H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.03%. Double-immunofluorescence staining used secondary Alexa488-labelled anti-mouse antibody and Alexa688-labelled anti-rabbit antibody (Life Technologies Invitrogen) coupled to fluorescence amplification with the TSA Fluorescent Plus System (Perkin Elmer, Waltham, MA).

### ***Northern blots and in vitro transcription of RNAs***

PolyA<sup>+</sup> RNA (PolyA Tract System, Promega Inc) was separated by electrophoresis on 2 % agarose / 2 M Formaldehyde gels (8 $\mu$ g polyadenylated RNA / lane) and transferred to nylon membranes. Hybridization and revelation was performed as described [36] with 100ng/mL of DIG-labeled antisense cRNA probe. This probe overlapped the 3'-untranslated region of the Exon-3 of the human *CDX2* gene, and was in vitro transcribed by T7 RNA polymerase from plasmid pCRII-TOPO-miniCDX2 linearized with BsrGI. A DIG-labeled human GAPDH probe was used for normalization.

For in vitro transcription of capped and uncapped RNA, templates were amplified from pATG1, pATG1-ATG2, pATG1m-ATG2 and pGL3-control with Tption-f / Tption-r (TTTTTTTTTTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGCCTAGGCTTTTGCAAAAAGCTT / (T)42CACTGCATTCTAGTTGTG) containing respectively the T7 promoter and polydT sequences, using Platinum TaqPCRx DNA polymerase. After purification (QIAquick PCR Purification kit, Qiagen, Venio, The Netherlands), 1µg of each PCR fragment was in vitro transcribed with or without of m7G(5')ppp(5')G RNA Cap (S1404S BioLabs, Ipswich, MA) in the ratio of 1 GTP / 4 GTPcap, in 25 µL using HiScribe T7 In Vitro Transcription kit (BioLabs). After treatment with DNase RQ1 treatment, RNAs were precipitated in NH4-acetate 2,5M on ice, washed in 70% ethanol and solubilized in 5 µL RNase free water.

### ***RT-PCR and RTqPCR***

RNA was prepared using TRI Reagent (Life Technologies Ambio, Houston, TX) and treated with DNase (RQ1 RNase-free DNase, Promega Inc). Reverse transcription was performed with 2 µg RNA using SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen) and Oligo(dT)12-18 primer (Invitrogen).

RT-PCR used 1/10th of the RT solution. Concomitant amplification of the two splicing forms of the human *CDX2* gene was performed with primers CDX21F/CCR (GCAGCCTCCAGCGTCGGTC / TCAGCCTGGAATTGCTCTGC) for 35 cycles (30 sec at 95°C, 30 sec at 55°C and 1.5 min at 68°C). Specific amplification of the mouse *CDX2* mRNA and *miniCDX2* mRNA respectively used the primer pairs mhC2F1f / mhC2E3r (CCCTCGCCACCATGTACG / CTCTGCGGTTCTGAAACCA) and mhC2Tqf (CCCTCGCCACCATGAAAA) / mhC2E3r.

For RTqPCR, 2 µg of mouse intestinal RNA or 1 µg of human Caco2-TC7 cell RNA were reverse transcribed in 20 µL using the AMV Reverse Transcriptase kit (Invitrogen) and oligo-dT. RTqPCR was performed on 1 µL of RT reaction in 20 µL using Syber Green PCR Master Mix (Life Technologies Applied Biosystems) and 7500 Real-time PCR System (Life Technologies Applied Biosystems). For mouse RNA, the cycles were 95°C 15 sec, 57°C 1 min, with the primers: CCCTCGCCACCATGAAAA / GTGATGTATCGACTAAAGTG for *miniCDX2*, CTAGGAAGCCAAGTGAAAAC / GTGATGTATCGACTAAAGTG for *CDX2*, and CCCACAACCTCTCCATTCT / GCAGGAGTGATAGGGGTCAT for *TBP*. For Caco2TC7 cell RNA, the cycles were 95°C 15 sec, 68°C 1 min with the primers:

CCCTCGCCACCATTGAAAA / TGCCTCTCAGAGAGCCCCAGCGTGG for *miniCDX2*,  
CTCGGCAGCCAAGTGAAAAC / GTGATGTAGCGACTGTAGTG for *CDX2*, and  
TGCACAGGAGCCAAGAGTGAA / CACATCACAGCTCCCCACCA for *TBP*.

Quantification of the Sucrase-Isomaltase (SI), MMP7, P27KIP1, EGF, and TBP transcripts was performed by RTqPCR using diluted RT products (5-10x) mixed with TaqMan Master Mix, gene-specific TaqMan probe and the primers sets (TaqMan Gene Expression assays, Life Technologies Applied Biosystems): SI, Hs00356112\_m1; MMP7, Hs01042795\_m1; P27KIP1, Hs01597588\_m1; EGF, Hs01099999\_m1; TBP, Hs99999910\_m1.

Analysis of the results (triplicates) was performed with the 7500 software v2.0.1 (Life Technologies Applied Biosystems) using the relative  $\Delta\Delta C_t$  quantification method.

### ***Co-immunoprecipitations (coIP), Western blots***

Transfected cells were lysed in 50 mM Tris buffer pH 7.4 with 150 mM NaCl / 1 mM EDTA / 1% Triton X-100 and protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostic, Mannheim, Germany). After centrifugation at 12000g for 20 mn at 4°C, 1 mg of supernatant was incubated overnight at 4°C with gentle rocking in 1 mL of lysis buffer containing anti-Flag (clone M2, Sigma Aldrich, 5 µg / mg lysate) or anti-β-catenin antibody (clone 14, BD Biosciences, 1µg / mg lysate). Immunoprecipitation was carried out by adding 30 µL of 50% G-agarose beads (anti-HA 3F10, Roche Applied Science, Penzberg, Germany) for 2 hours at 4°C. Immunoprecipitates were washed in lysis buffer with 0.15 M NaCl for β-catenin coIP and 0.5 M NaCl for Flag coIP, and eluted using SDS-PAGE sample loading buffer. Western blots were performed as described [24].

### ***Chromatin immunoprecipitations (ChIP)***

Transfected HCT116 cells were fixed with 1% (v/v) formaldehyde for 10 min at RT and quenched with 0.125 M Glycine for 5 min. ChIPs were carried out using the EZ-Magna ChIP™ G Chromatin Immunoprecipitation kit (Upstate Millipore, Billerica, MA). Sheared crosslinked chromatin from ~ 10<sup>6</sup> cells was incubated overnight at 4°C with 1 µg of normal mouse IgG (Upstate Millipore) or the appropriate antibody. Input corresponds to non-immunoprecipitated sheared crosslinked chromatin from 10<sup>5</sup> cells. PCR analysis was performed with 1/25th of immunoprecipitated DNA as template and primers located in the

human SI promoter (GGCTGGTAAGGGTGCAATAA / GCCTGTTCTCTTTGCTATGTTG; annealing: 55 °C).

### ***In vitro DNA repair assays***

Cell free extracts were prepared as follows.  $3 \times 10^7$  transfected cells were washed in cold PBS, suspended in four packed cell volumes of cold hypotonic lysis buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.6, 1 mM DTT, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA and protease inhibitors), incubated for 40 min on ice and disrupted using a Dounce homogenizer (40 strokes). Sucrose was added to reach 250 mM. Extracts were centrifuged 10 min at 1000 g to discard cell debris and washed again in hypotonic lysis buffer containing 250 mM sucrose. Nuclear pellet was then suspended in two volumes of nuclear extraction buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.6, 1 mM DTT, 2 mM EDTA, 20% glycerol, 500 mM NaCl and protease inhibitors) and incubated for 30 minutes on ice. Nuclear extracts were clarified by 30 min centrifugation at 21000 g and dialyzed overnight against 20 mM Tris-HCl pH 7.6, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 20% glycerol, 25 mM NaCl and 0.2 mM PMSF.

End-joining reaction was performed in 30  $\mu$ L by incubating 50 ng of BamHI-linearized pcDNA3 plasmid with 5 mg of nuclear extract for 1 h at 25°C in 50 mM Tris-HCl pH 7.6, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM ATP, 1 mM DTT, 50 mM dNTP, 80 mM NaCl and protease inhibitors. Reaction was stopped by RNase treatment (0.25 mg mL<sup>-1</sup> of RNase for 10 min at 37°C) followed by proteinase K (0.5% SDS, 50 mM EDTA and 1 mg mL<sup>-1</sup> of proteinase K at 37°C for 1 h). DNA was purified by phenol and chloroform extraction, recovered by ethanol precipitation and analyzed by electrophoresis on a 0.85% agarose gel.

### ***Statistical analyses***

P-value calculation indicated significant differences tested by one-way analysis of variance followed by a Newman–Keuls test by pairs.

## References

1. Chawengsaksophak K, James R, Hammond VE, *et al.* Homeosis and intestinal tumours in Cdx2 mutant mice. *Nature* 1997;385:84-87
2. Beck F, Chawengsaksophak K, Waring P, *et al.* Reprogramming of intestinal differentiation and intercalary regeneration in cdx2 mutant mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:7318-7323
3. Gao N, White P, Kaestner KH. Establishment of intestinal identity and epithelial-mesenchymal signaling by Cdx2. *Dev Cell* 2009;16:588-599
4. Verzi MP, Shin H, Ho LL, Liu XS, Shivdasani RA. Essential and redundant functions of caudal family proteins in activating adult intestinal genes. *Mol Cell Biol* 2011;31:2026-2033
5. Stringer EJ, Duluc I, Saandi T, *et al.* Cdx2 determines the fate of postnatal intestinal endoderm. *Development* 2012;139:465-474
6. Crissey MA, Guo RJ, Funakoshi S, *et al.* Cdx2 levels modulate intestinal epithelium maturity and Paneth cell development. *Gastroenterology* 2011;140:517-528
7. Verzi MP, Shin H, He HH, *et al.* Differentiation-specific histone modifications reveal dynamic chromatin interactions and partners for the intestinal transcription factor CDX2. *Dev Cell* 2010;19:713-726
8. Gao N, Kaestner KH. Cdx2 regulates endo-lysosomal function and epithelial cell polarity. *Genes Dev* 2010.24:1295-1305
9. De Sousa E Melo F, Wang X, Jansen M, *et al.* Poor-prognosis colon cancer is defined by a molecularly distinct subtype and develops from serrated precursor lesions. *Nat Med* 2013;19:614-618
10. Bonhomme C, Duluc I, Martin E, *et al.* The Cdx2 homeobox gene has a tumour suppressor function in the distal colon in addition to a homeotic role during gut development. *Gut* 2003;52:1465-1471
11. Gross I, Duluc I, Benameur T, *et al.* The intestine-specific homeobox gene Cdx2 decreases mobility and antagonizes dissemination of colon cancer cells. *Oncogene* 2008;27:107-115
12. Silberg DG, Sullivan J, Kang E, *et al.* Cdx2 Ectopic Expression Induces Gastric Intestinal Metaplasia in Transgenic Mice. *Gastroenterology* 2002;122:689-696
13. Mutoh H, Hakamata Y, Sato K, *et al.* Conversion of gastric mucosa to intestinal metaplasia in Cdx2-expressing transgenic mice. *BBRC* 2002;294:470-479

14. Scholl C, Bansal D, Dohner K, *et al.* The homeobox gene CDX2 is aberrantly expressed in most cases of acute myeloid leukemia and promotes leukemogenesis. *J Clin Invest* 2007;117:1037-1048
15. Kozak M. Pushing the limits of the scanning mechanism for initiation of translation. *Gene* 2002;299:1-34
16. Stoneley, M, Willis AE. Cellular internal ribosome entry segments: structures, trans-acting factors and regulation of gene expression. *Oncogene* 2004;23:3200-3207
17. Guo RJ, Funakoshi S, Lee HH, *et al.* The intestine-specific transcription factor Cdx2 inhibits beta-catenin/TCF transcriptional activity by disrupting the beta-catenin-TCF protein complex. *Carcinogenesis* 2010;31:159-166
18. Aoki K, Kakizaki F, Sakashita H, *et al.* Suppression of colonic polyposis by homeoprotein CDX2 through its nontranscriptional function that stabilizes p27Kip1. *Cancer Res* 2011;71:593-602
19. Renouf B, Soret C, Saandi T, *et al.* Cdx2 homeoprotein inhibits non-homologous end joining in colon cancer but not in leukemia cells. *Nucl Acids Res* 2012;40:3456-3469
20. Offield MF, Jetton TL, Labosky PA, *et al.* PDX-1 is required for pancreatic outgrowth and differentiation of the rostral duodenum. *Development* 1996;122:983-995
21. Powell AE, Wang Y, Li Y, *et al.* The pan-ErbB negative regulator Lrig1 is an intestinal stem cell marker that functions as a tumor suppressor. *Cell* 2012;149:146–158
22. Kelemen O, Convertini P, Zhang Z, *et al.* Functions of alternative splicing. *Gene* 2012;514:1-30
23. Rings EH, Boudreau F, Taylor JK, *et al.* *Gastroenterology* 2001;121:1437-1450
24. Gross I, Lhermitte B, Domon-Dell C, *et al.* Phosphorylation of the homeotic tumor suppressor Cdx2 mediates its ubiquitin-dependent proteasome degradation. *Oncogene* 2005;24:7955-7963
25. Collombat P, Hecksher-Sorensen J, Krull J, *et al.* Embryonic endocrine pancreas and mature beta cells acquire alpha and PP cell phenotypes upon Arx misexpression. *J Clin Invest* 2007;117:961-970
26. El Marjou F, Janssen KP, Chang BH, *et al.* Tissue-specific and inducible Cre-mediated recombination in the gut epithelium. *Genesis* 2004;39:186-193
27. Benahmed F, Gross I, Gaunt SJ, *et al.* Multiple regulatory regions control the complex expression pattern of the mouse Cdx2 homeobox gene. *Gastroenterology* 2008;135:1238-1247

28. Aberle H, Bauer A, Stappert J, *et al.* Beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J* 1997;16:3797-3804
29. Tetsu, O, McCormick F. Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* 1999;398:422-426
30. Van de Wetering M, Cavallo R, Dooijes D, *et al.* Armadillo coactivates transcription driven by the product of the Drosophila segment polarity gene dTCF. *Cell* 1997;88:789-799
31. Rodolosse A, Chantret I, Lacasa M, *et al.* A limited upstream region of the human sucrase-isomaltase gene confers glucose-regulated expression on a heterologous gene. *Biochem J* 1996;315: 301-306
32. Chantret I, Rodolosse A, Barbat A, *et al.* Differential expression of sucrase-isomaltase in clones isolated from early and late passages of the cell line Caco-2: evidence for glucose- dependent negative regulation. *J Cell Sci* 1994;107:213-225
33. Brattain MG, Fine WD, Khaled FM, *et al.* Heterogeneity of malignant cells from a human colonic carcinoma. *Cancer Res* 1981;41:1751-1756
34. Leibovitz A, Stinson JC, McCombs WB III, *et al.* Classification of human colorectal adenocarcinoma cell lines. *Cancer Res* 1976;36: 4562-4569
35. Murakami H, Masui H. Hormonal control of human colon carcinoma cell growth in serum-free medium. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980;77:3464-3468
36. Lefebvre O, Sorokin L, Kedinger M, Simon-Assmann P. Developmental expression and cellular origin of the laminin alpha2, alpha4, and alpha5 chains in the intestine. *Dev Biol* 1999;210:135-150.

## FIGURES LEGENDS

### Figure 1: Characterization of the splice variant miniCDX2

**A.** The conserved motif of *Cdx2*-type genes. **B. a.** Luciferase activity in HCT116 cells transfected with the indicated reporter plasmids; X designates ATG<sub>1</sub> mutation into TAG in pATG1m and pATG1m-ATG2; pGI3-control was set to 100 and pGI3-basic gave background activity. **b.** Luciferase activity in HCT116 cells transfected with in vitro-transcribed polyadenylated RNA without (light grey) or with m7G cap (dark grey). Data are given as mean  $\pm$ SD for triplicates. **C.** *CDX2* gene map. **D.** RT-PCR on intestinal cell lines with *CDX21F* / CCR producing 2 bands corresponding to the *CDX2* and *miniCDX2* transcripts. **E. a.** Northern blot of polyA RNA from 3d and 14d Caco2-TC7 cells revealing the *CDX2* and *miniCDX2* mRNA. **b.** RTqPCR quantification of *CDX2* (light grey) and *miniCDX2* mRNA (dark grey) in 3d Caco2-TC7 cells (semi-logarithmic scale). **F. a.** RTqPCR of *CDX2* (light grey) and *miniCDX2* mRNA (dark grey) (semi-logarithmic scale) along the murine gut; *CDX2* was arbitrary set at 1 in the cecum. **b.** *CDX2* / *miniCDX2* ratio. **G.** Structure of the *CDX2* and *miniCDX2* proteins: TA, transactivation domain; HD, DNA-binding homeodomain; R, regulatory domain; the arrow shows the 12-aa Nter peptide of *miniCDX2*. **H.** Immunodetection of *miniCDX2* (C2T antibody) and *CDX2* proteins in the mouse proximal colon. Bars: 50  $\mu$ m.

### Figure 2: Molecular functions of miniCDX2 vs CDX2

**A. (a)** RTqPCR for *SI* RNA and **(b)** pSI-luc luciferase activity in HCT116 cells transfected with pFlag-miniCDX2 or pFlag-CDX2 or pFlag-CDX2 with increasing amounts of pFlag-miniCDX2; data are given as mean  $\pm$ SD for triplicates (\*\*\*) $p$ <0.001). **c.** HCT116 cells transfected with pFlag-CMV2 (lane 1), pFlag-CDX2 (lane 2) or pFlag-miniCDX2 (lane 3) were processed for ChIP with anti-Flag or IgG. DNA was PCR-amplified with primers of the *SI*, *LI-cadherin* and *Muc2* promoters. **d.** HCT116 cells transfected with pFlag-CMV2 (lane 1) or pFlag-CDX2 (lane 2) or pFlag-CDX2 with a 3-fold molar excess of pFlag-miniCDX2 (lane 3) or pFlag-miniCDX2 (lane 4) were processed for ChIP with anti-CDX2 or IgG; *SI* promoter DNA was amplified by PCR. **B. (a)** RTqPCR for *Mmp7* RNA and **(b)** TOP-Flash luciferase activity **(b)** HEK293 cells transfected with pS33A- $\beta$ -catenin, pMyc-Tcf4, pFlag-CDX2 and/or pFlag-miniCDX2; data are given as mean  $\pm$ SD for triplicates (\*\*\*) $p$ <0.001). **c.** Proteins from cells transfected with pS33A- $\beta$ -catenin alone (lane 1) or together with pFlag-CDX2 (lane 2) or with pFlag-miniCDX2 alone (lane 3) were immunoprecipitated with anti- $\beta$ -catenin or IgG and



analyzed by western blot with anti- $\beta$ -catenin and with anti-Flag to reveal Flag-CDX2 ( $\triangleright$ ) and Flag-miniCDX2 ( $\blacktriangleright$ ). **d.** Proteins from cells transfected with pS33A- $\beta$ -catenin and pMyc-Tcf4 together with increasing amounts of pFlag-CDX2 or pFlag-miniCDX2 were immunoprecipitated with anti- $\beta$ -catenin and analyzed by western blot with anti- $\beta$ -catenin and anti-Myc to check for  $\beta$ -catenin/Tcf4 interaction. **C.** **(a)** Western blot and **(b)** RTqPCR quantification of P27KIP1 RNA and protein in HCT116 cells transfected with pFlag-CMV2 (ctrl), pFlag-CDX2 or pFlag-miniCDX2. **c.** Clonogenic assays on HCT116 cells transfected with pFlag-CMV2 (ctrl), pFlag-CDX2 or pFlag-miniCDX2. Data are means  $\pm$ SD for triplicates (\*\*p<0.01). **D.** **a.** Proteins from cells transfected with pFlag-CMV2 (lane 1), pFlag-CDX2 (lane 2) or pFlag-miniCDX2 (lane 3) were immunoprecipitated with anti-Flag or IgG and analyzed by western blot with anti-Flag and anti-KU70/80 to check for KU70/80 interaction with Flag-CDX2 ( $\triangleright$ ) and Flag-miniCDX2 ( $\blacktriangleright$ ). **b** For DNA repair assays, linearized pcDNA3 (lane 1) was incubated with nuclear extracts of SW480 cells transfected with pFlag-CMV2 (lane 2), pFlag-CDX2 (lane 3) or pFlag-miniCDX2 (lane 4).

**Figure 3: Transgenic overexpression of miniCDX2**

**A.** The *jojo-Flag-miniCDX2* transgene with the CAG promoter, the loxP/Cre-excisable cassette containing the GFP coding sequence followed by the transcriptional stop (pA), and the Flag-miniCDX2 coding sequence. **B.** Serial sections of few villi of *jojo-Flag-miniCDX2 // VilCre* mice showed Flag-miniCDX2 expression accompanied by loss of Alkaline Phosphatase and ectopic expression of Claudin-18. Bar: 50  $\mu$ m. **C.** MiniCDX2 and CDX2 immunodetection at the boundary between normal cecum and foregut-type heteroplasia (\*) in *Cdx2<sup>+/-</sup>* mice. Bars: 50  $\mu$ m. **D. a.** Immunostaining of miniCDX2 and CDX2 in the glandular stomach. Bars: 20  $\mu$ m. **b.** RTqPCR quantification of *CDX2* (light grey) and *miniCDX2* mRNA (dark grey) in the stomach and duodenum. The *CDX2* mRNA was arbitrary set at 1 in the duodenum.

#### Figure 4: Overexpression of miniCDX2 in Brunner's glands

**A.** Immunostaining of miniCDX2 and CDX2 in Brunner's glands; bars: 50  $\mu$ m. **B. a.** GFP immunostaining reveals transgene expression in Brunner's glands of *jojo-Flag-miniCDX2* mice; **b.** In *jojo-Flag-miniCDX2 // VilCre* mice, loxP recombination eliminates GFP and turns on Flag-miniCDX2 expression detected by Flag immunostaining; bars: 100  $\mu$ m. **C.** Immunofluorescence staining of PDX1 in the Brunner's glands *jojo-Flag-miniCDX2* (control) and *jojo-Flag-miniCDX2 // VilCre* mice (miniCDX2); bars: 100  $\mu$ m. **D. a.** Histological staining of the Brunner's glands of *jojo-Flag-miniCDX2 // VilCre* mice (miniCDX2) compared to *jojo-Flag-miniCDX2* animals (control); bars: 500  $\mu$ m. **b.** Quantification of the surface of Brunner's glands in 2-4 month-old *jojo-Flag-miniCDX2* (ctrl, n=12) and *jojo-Flag-miniCDX2 // VilCre* mice (n=9); \*\*p<0.01. **E.a.** Histology of a polyp in an 18 month-old *jojo-Flag-miniCDX2 // VilCre* mouse near the gastric-intestinal boundary (arrow). (i), (ii) and (iii) respectively designate the expanded Brunner's glands (encircled), the hyper-proliferating crypts and the surface area. Arrowhead locates squamous stratified epithelium. Bar: 500  $\mu$ m. **b.** Immunostaining of SOX2 and P63 in squamous stratified structures (left panel) and of SOX2 and Claudin-18 at the surface epithelium (right panel). Bars: 50  $\mu$ m. **c.** Phospho-EGFR immunodetection in Brunner's glands area (zone i) and in proliferating crypts area (zone ii), compared to normal adjacent duodenal crypts; bar: 50  $\mu$ m.

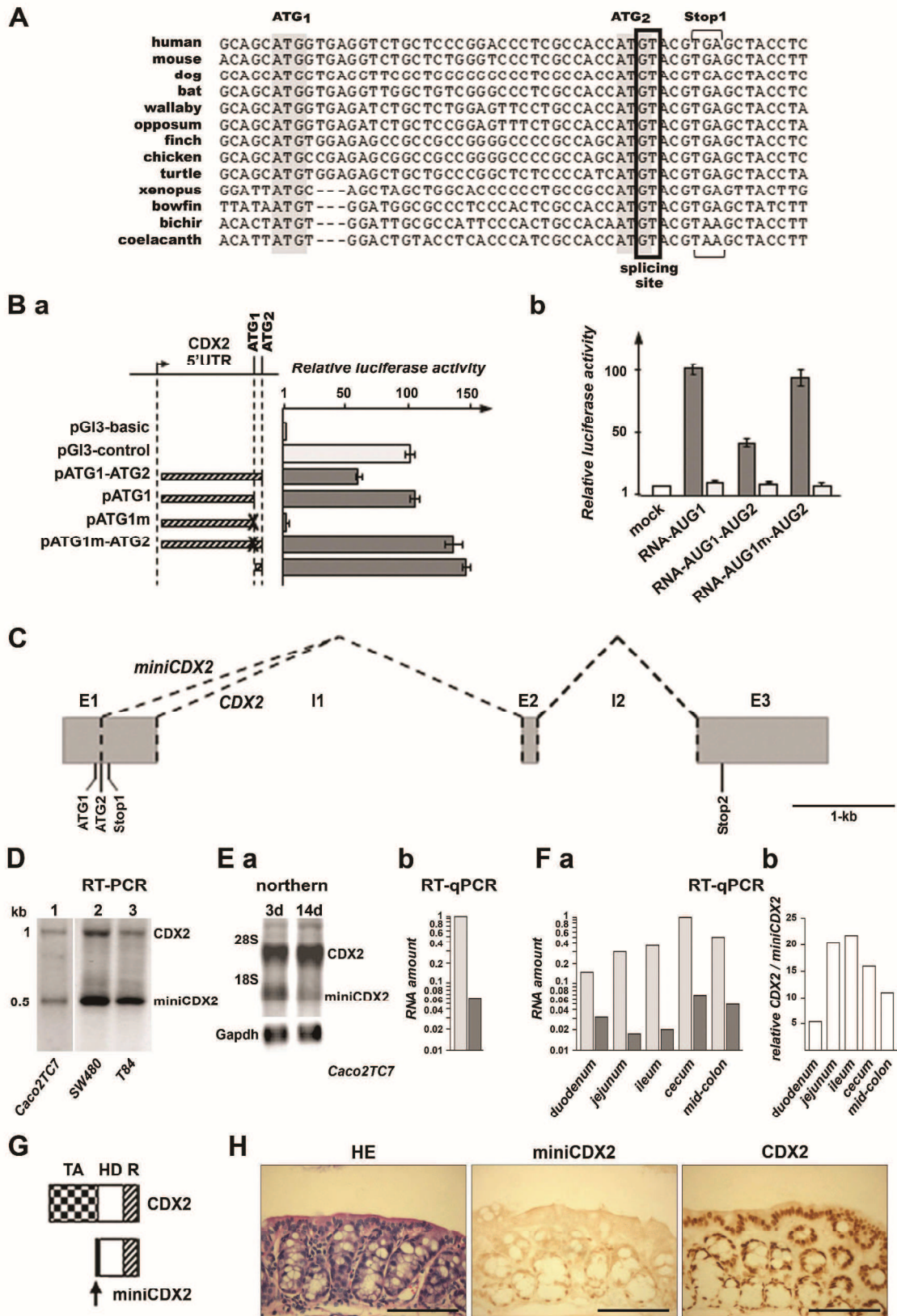


Figure 1

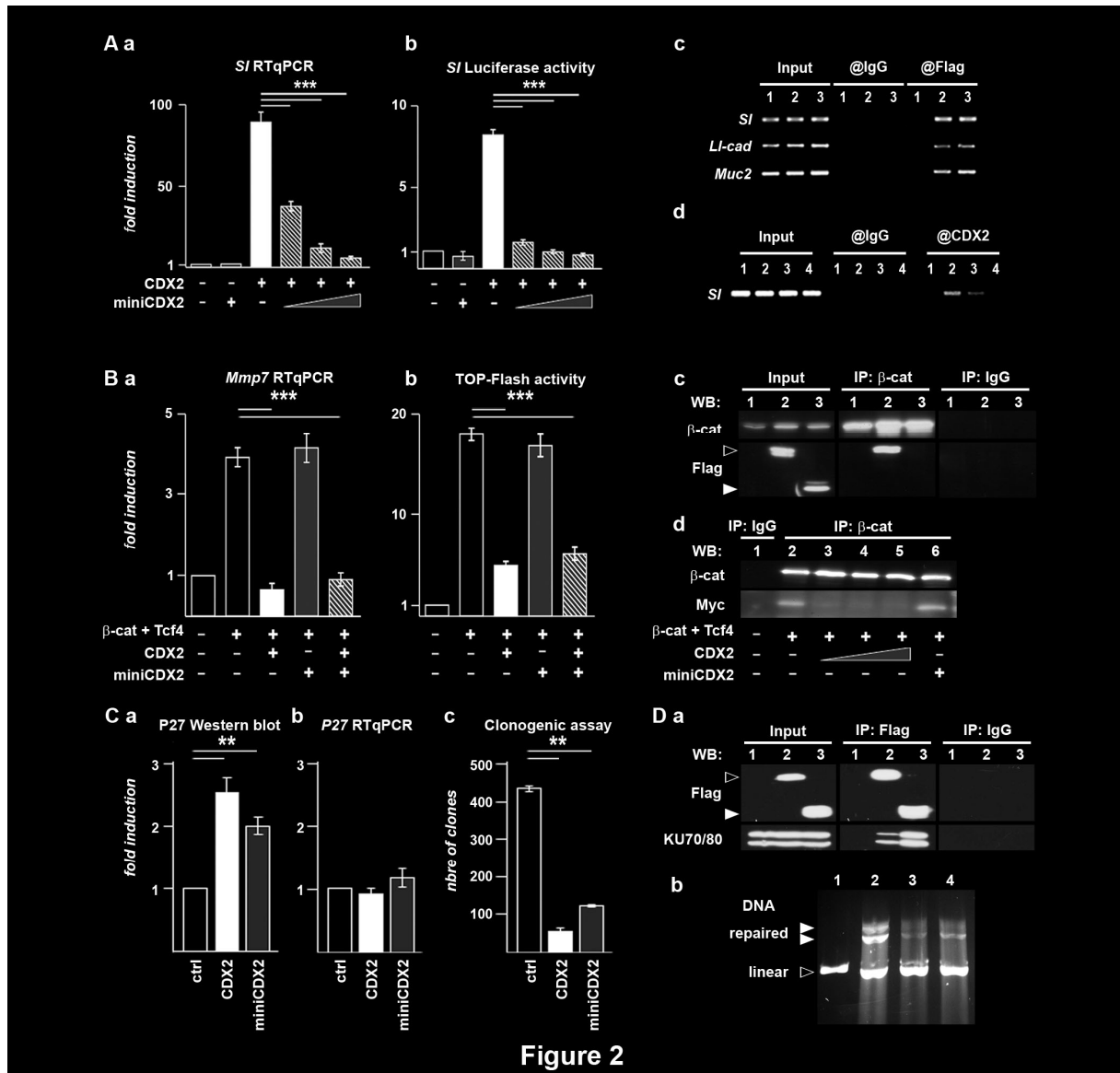
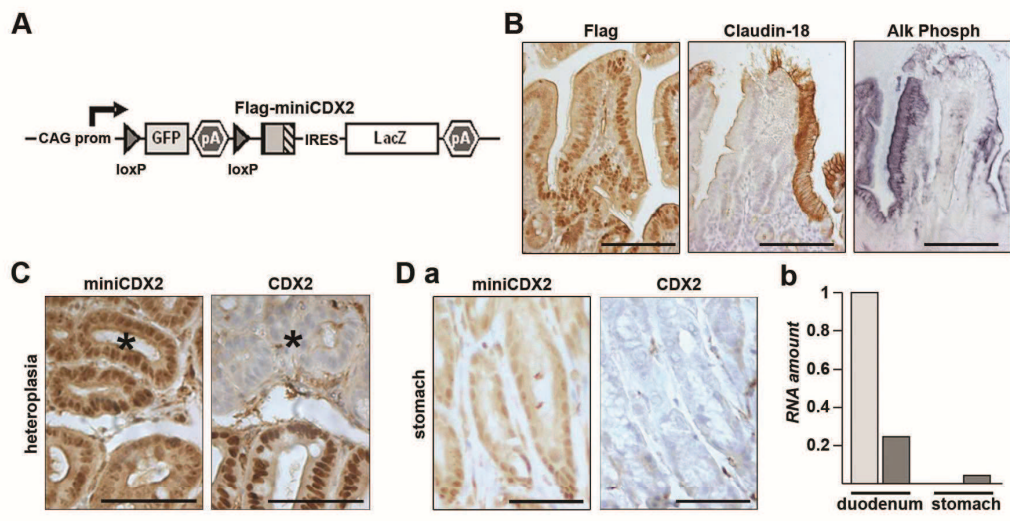
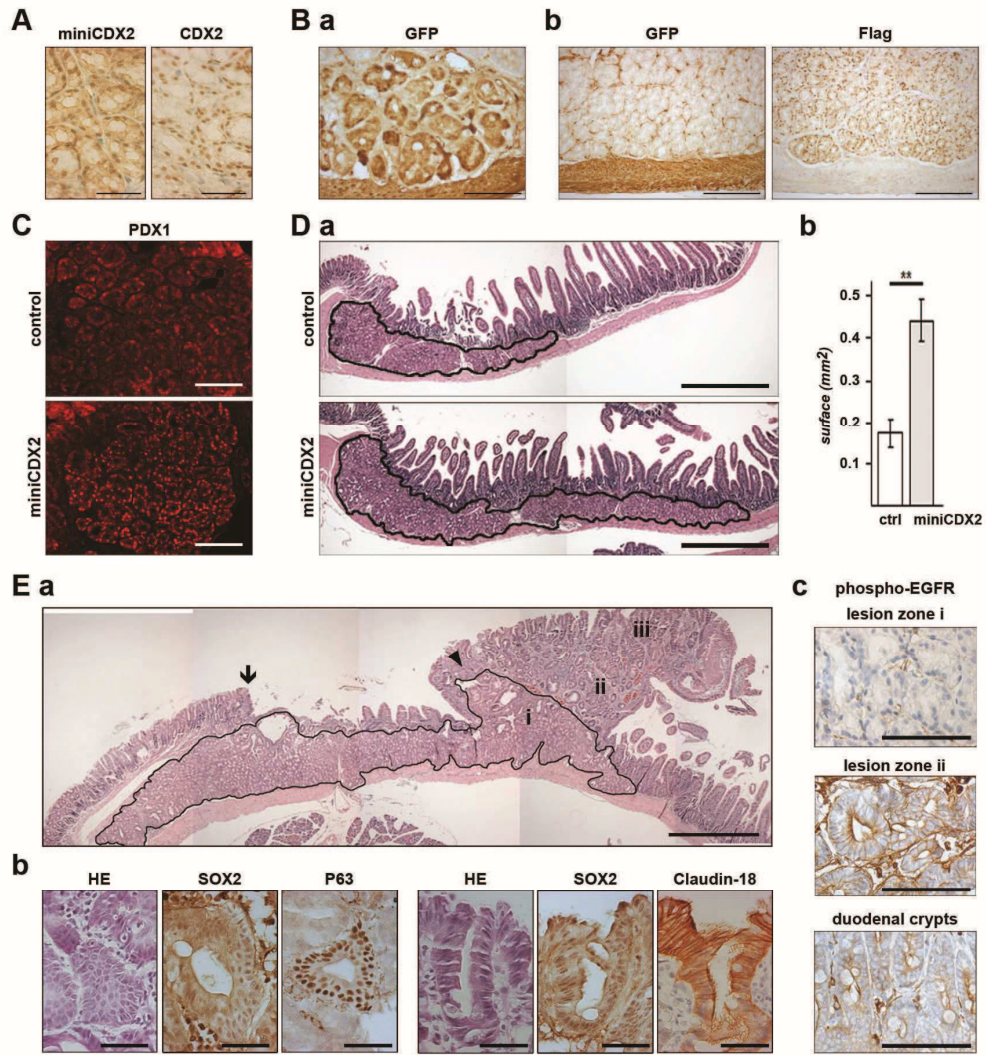


Figure 2



**Figure 3**



**Figure 4**

## Legend of the Supplemental Figures

### Fig S1: Sequence alignment

Alignment of 40 *CDX* gene sequences in the region surrounding the canonical ATG codon used as start site for CDX protein translation (highlighted in green, arrow). The canonical ATG corresponds to ATG<sub>2</sub> in Fig. 1A and in the text. Other ATGs present in these 150-bp sequences are highlighted in green if they are in the same frame as the CDX protein translation start codon, or in red or blue for the two other frames. Stop codons in the corresponding frames are in the same colors. The conserved T following the CDX protein start site is highlighted in purple. The region boxed for *CDX2*-type genes is also shown in the Fig. 1A.

### Fig S2: Sequence of the *CDX2* and *miniCDX2* variants

Sequence of the two RT-PCR fragments amplified from Caco2-TC7 cells RNA using the primers CDX2-1F / CDX2-3R: they correspond to the major *CDX2* mRNA and to the splicing variant *miniCDX2*, respectively. Dots indicate the segment missing in *miniCDX2*. E1/E2 and E2/E3 mark the boundaries between Exon-1 and -2 and between Exon-2 and -3 in the *CDX2* transcript. Sequences of the CDX2 and *miniCDX2* proteins are given in capital letters. The translation start site used for the CDX2 protein is ATG<sub>2</sub> and the one for *miniCDX2* is ATG<sub>1</sub>. The DNA-binding homeodomain is underlined. The translation stop codon Stop1 is in frame with ATG<sub>1</sub> in the *CDX2* transcript but out of frame with ATG<sub>2</sub>; it is lost in the *miniCDX2* variant. The stop codon Stop2 is used for both CDX2 and *miniCDX2* proteins. The Genbank accession number of the *miniCDX2* sequence is KJ531444.

### Fig S3: The *miniCDX2* protein

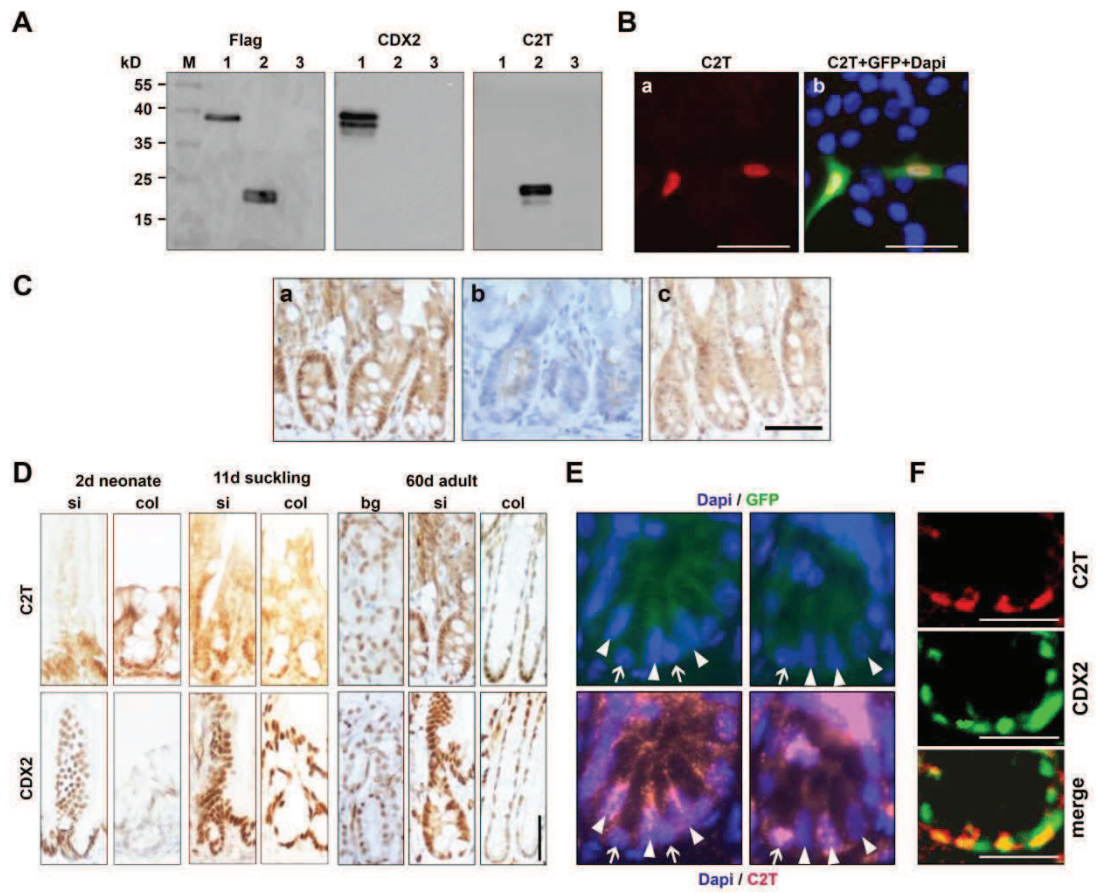
**A.** HCT116 cells transfected with the plasmid pFlag-CDX2 (lane 1), with pFlag-*miniCDX2* (lane 2) or with the control vector pFlag-CMV2 (lane 3) were analyzed by western blot with Flag, CDX2 or C2T antibodies. The Flag antibody reveals both Flag-CDX2 and Flag-*miniCDX2* proteins, whereas the CDX2 and C2T antibodies specifically detect Flag-CDX2 and Flag-*miniCDX2*, respectively. **B.** HCT116 cells co-transfected with pFlag-*miniCDX2* and pEGFP showed nuclear localization of Flag-*miniCDX2* (Flag antibody, red) (**a**); (**b**), same as

(a) with Dapi staining of the nuclei (blue) and GFP identification of transfected cells (green). Bars: 10  $\mu\text{m}$ . **C. a.** Immunostaining of the jejunum of wild type mice with the C2T antibody reveals nuclear staining in crypt cells; **b.** same as in (a) except that C2T was preincubated with the immunogenic peptide; **c.** C2T immunostaining of the jejunal mucosa of *Cdx2<sup>flox/flox</sup> // AhCre<sup>ERT</sup>* mice treated with Tamoxifen for 5 days, which produces a mosaic knockout of the Exon-2 of the *Cdx2* gene. Bar: 20  $\mu\text{m}$ . **D.** Histological sections of the small intestine (si) and colon (col) of 2 days neonate, 11 days suckling and adult mice were immunostained with the C2T and CDX2 antibodies. Bar: 20  $\mu\text{m}$ . **E.** Double immunofluorescence of C2T and GFP in small intestinal crypts of *Lgr5-Cre<sup>ERT2</sup>-IRES-GFP* mice. C2T labels most of the GFP-positive cells corresponding to Crypt Base Columnar cells (arrowheads) as well as some but not all Paneth cells (arrows). **F.** Co-immunostaining of the proximal colon with C2T and CDX2 antibodies.









Supplementary Fig 3

### 3. Conclusion

Dans l'épithélium intestinal, un variant d'épissage de *Cdx2*, *miniCdx2* est exprimé. Il agit en tant que dominant-négatif sur l'activité transcriptionnelle de CDX2. En revanche, il n'a aucun effet sur la voie Wnt normalement inhibée de manière non-transcriptionnelle par CDX2. Enfin, miniCDX2 possède le même effet que CDX2 sur la stabilisation de p27<sup>Kip1</sup> et l'inhibition de la réparation de l'ADN.

L'expression de ce variant d'épissage constitue donc un moyen supplémentaire de réguler l'activité de CDX2.

Ce travail démontre, une fois de plus, que CDX2 ne nécessite pas son domaine de transactivation pour interagir avec KU70/80 et inhiber la réparation de l'ADN. Et qu'en plus de CDX2, miniCDX2 veille également à l'intégrité du génome des cellules intestinales.

## CONCLUSIONS ET DISCUSSION

---

## 1. Une nouvelle fonction non-transcriptionnelle de CDX2

CDX2 est un facteur de transcription à homéodomaine indispensable au développement et au maintien de l'épithélium intestinal. Sa première fonction est d'activer la transcription de ses gènes cibles, notamment des gènes spécifiques de l'intestin tels que la *Saccharase Isomaltase* ou encore la *Li-cadhérine*. Cependant, CDX2 possède également des fonctions indépendantes de son activité transcriptionnelle : CDX2 stabilise la protéine p27<sup>Kip1</sup> en inhibant sa polyubiquitynation (Aoki et al., 2011) ; CDX2 interagit avec NFκB empêchant ainsi sa fixation sur ses gènes cibles, comme *Cox2*, et leur transcription (Mutoh et al., 2007) ; CDX2 inhibe également la voie Wnt en se fixant à la β-caténine qui ne peut alors plus interagir avec TCF et activer leurs gènes cibles (Guo et al., 2010).

Au cours de ma thèse, j'ai pu mettre en évidence une nouvelle fonction non-transcriptionnelle de CDX2 : la régulation de la réparation des cassures double-brins de l'ADN. En effet, en interagissant avec les protéines de réparation KU70/80, CDX2 inhibe la réparation de l'ADN.

CDX2 n'est pas le seul facteur de transcription à homéodomaine possédant des fonctions non-transcriptionnelles. La protéine PRH (Proline-Rich Homeodomain) interagit avec le facteur d'initiation de la traduction eIF4E inhibant ainsi sa fonction de transporteur des ARNm (Topisirovic et al., 2003). Des variants d'épissages des protéines homéotiques MEIS2 et CSX1 délétés de leur homéodomaine, bien que ne pouvant plus se fixer sur l'ADN de leurs gènes cibles, continuent de les réguler par des mécanismes indépendants de la transcription (Shiojima et al., 1996; Yang et al., 2000).

De plus en plus d'études mettent au grand jour de nouvelles fonctions non-transcriptionnelles des protéines homéotiques. Ces protéines ne servent donc pas uniquement à activer la transcription de leurs gènes cibles, mais à bien plus d'autres fonctions diverses et variées telles la réparation de l'ADN et le transport des ARNm (Rezsohazy, 2014).

Les gènes homéotiques tiennent une grande place dans le développement embryonnaire et leur rôle, si important dans la régulation fine de la transcription des gènes permettant la « construction » entière d'un embryon dans toute sa complexité, n'est plus à démontrer et leur a valu le titre de « gènes architectes ». Cependant, noyés dans le flot d'innombrables autres protéines chez l'adulte, les protéines homéotiques ne sont pas pour autant à mettre de côté. Elles assurent des fonctions essentielles pour maintenir l'homéostasie de la cellule et d'un tissu, en général, en jouant sur la prolifération, la différenciation, la transcription, la traduction, l'intégrité du génome...

## 2. *Cdx2*, un suppresseur de tumeur dans le côlon

CDX2, en interagissant avec KU70/80, inhibe la réparation des cassures de l'ADN par le mécanisme du NHEJ. Cette voie de réparation n'est pas fidèle et peut engendrer la survenue de translocations chromosomiques, mutations et délétions pouvant engendrer un développement tumoral (Bunting and Nussenzweig, 2013). Les cassures de l'ADN non réparées conduisent la cellule vers la mort par apoptose. CDX2, en inhibant le NHEJ favoriserait alors l'apoptose plutôt que la réparation qui risquerait de causer des altérations génétiques. Ceci est en accord avec les résultats obtenus par Bonhomme et al. démontrant un rôle de CDX2 dans l'apoptose. En effet, nous avons vu que l'épithélium du côlon des souris *Cdx2*<sup>-/-</sup> irradiées aux rayons  $\gamma$  pour induire une apoptose, présente moins de caspase-3 activée que celui des souris sauvages. La perte d'un allèle de *Cdx2* entraîne donc une résistance accrue à l'apoptose induite chimiquement (Bonhomme et al., 2003). De plus, la surexpression de *Cdx2*, dans les cellules cancéreuses coliques en culture, diminue la survie cellulaire après un traitement à l'étoposide qui induit l'apparition de cassures double-brins d'ADN en bloquant la topoisomérase II (Renouf et al., 2012). L'ensemble de ces résultats implique CDX2 dans le contrôle de l'apoptose. Mais le mécanisme par lequel CDX2 module les mécanismes apoptotiques restent inconnus. Cependant, CDX2 interagit avec les protéines KU qui régulent le mécanisme d'apoptose médié par la protéine pro-apoptotique BAX, en la séquestrant dans le cytoplasme (Rathaus et al., 2009). CDX2 serait-elle capable de favoriser le relargage de BAX en interagissant avec les protéines KU ? En effet, il est envisageable, par exemple, que CDX2 favorise la libération ou empêche la séquestration de BAX par KU70 à l'image de son action sur l'interaction entre la  $\beta$ -caténine et TCF. J'ai réalisé des expériences préliminaires de co-immunoprécipitation pour tenter de mettre en évidence une compétition entre CDX2 et BAX mais sans succès.

Par ailleurs, KU70/80 régule négativement l'expression d'*Apaf1* (régulateur de l'apoptose) en se fixant sur des éléments répresseurs de son promoteur. Ceci permet de « donner du temps » à la cellule pour réparer les cassures avant de déclencher l'apoptose dans le cas où la cellule ne peut pas les réparer efficacement. Dans ce cas, les protéines KU70/80 se retirent du promoteur d'*Apaf1* permettant ainsi son expression et l'induction des voies apoptotiques (De Zio et al., 2010). CDX2, par son interaction avec KU70/80, pourrait également moduler l'expression d'*Apaf1* indirectement en empêchant les protéines KU de se fixer sur son promoteur. Le niveau d'expression d'*Apaf1* en présence et en absence de CDX2 peut facilement être mesuré par PCR quantitative et la présence des protéines KU sur le promoteur d'*Apaf1* révélée par des expériences d'immunoprécipitation de chromatine.

Enfin, les protéines KU interviennent aussi dans le maintien des télomères, éléments indispensables pour l'intégrité du génome. Nous nous sommes demandés si CDX2 avait également un impact sur cette fonction. J'ai réalisé les premières expériences qui consistaient à voir si CDX2 module l'activité de la télomérase. Les premiers résultats démontraient une diminution de son activité lorsque l'expression de *Cdx2* est induite dans des cellules cancéreuses coliques HT29, dans lesquelles l'expression de CDX2 peut être induite. Ce travail a été repris, par la suite, par Camille Balbinot (étudiante en M2 puis en thèse). Elle confirme ces résultats, cependant, il n'y a pas d'effet observé dans les autres lignées cellulaires en transfection transitoire. De même, l'utilisation de siARN pour éteindre l'expression de *Cdx2*, ne modifie pas l'activité de la télomérase. CDX2 ne modifie pas non plus l'expression de la télomérase ni de ses partenaires. Une interaction entre CDX2 et la télomérase a été observée, une fois, par co-immunoprécipitation mais n'a pas pu être confirmée. Les résultats restent donc assez controversés et ne permettent pas de tirer de conclusion quant à un éventuel rôle de CDX2 sur le maintien des télomères.

*Cdx2* exerce donc sa fonction de suppresseur de tumeur en agissant sur plusieurs mécanismes, qui, s'ils sont dérégulés peuvent entraîner la transformation de la cellule et le développement tumoral. CDX2 inhibe la prolifération cellulaire ainsi que le NHEJ, il stimule la différenciation et semble favoriser l'apoptose.

Cependant, son action de suppresseur de tumeur se restreint à l'épithélium intestinal où il est normalement exprimé. En situation ectopique, comme c'est le cas dans la lignée hématopoïétique, il exerce une fonction oncogénique. Cette fonction de *Cdx2* est donc tissu spécifique. Ceci n'est pas le cas de tous les suppresseurs de tumeur, en effet, par exemple, *p53* qui est un gène impliqué dans la cancérogenèse colique, n'exerce pas cette fonction uniquement dans le côlon mais dans tout l'individu. *p53* est muté dans bon nombre d'autres cancers tels que le cancer du sein (Raman et al., 2000), du pancréas (Casey et al., 1993) ou encore dans les carcinomes hépatocellulaires (Hsu et al., 1991).

### 3. *Cdx2*, un « lineage-survival oncogene »

Bien que le rôle de suppresseur de tumeur de *Cdx2* soit bien établi et démontré par de nombreux groupes, il n'en reste pas moins que son expression reste souvent élevée dans la majorité des tumeurs intestinales de types différenciées, ouvrant la question de savoir quel rôle pourrait-il avoir dans ces tumeurs. Ainsi, certains lui attribuent un rôle d'oncogène dans un contexte génétique particulier de la tumeur intestinale, celui d'une amplification du chromosome 13 (Salari et al., 2012).



En effet, cette amplification, incluant le locus du gène *Cdx2*, est observée dans un certain nombre de tumeurs colorectales, ainsi que dans des lignées cellulaires cancéreuses coliques. Dans ce contexte où le chromosome 13 est amplifié, la surexpression de *Cdx2* promeut alors la prolifération et la survie cellulaire, notamment par la voie Wnt/ $\beta$ -caténine. *Cdx2* est défini comme un « lineage-survival oncogene » : il exerce un pouvoir oncogénique en même temps qu'il dicte une identité intestinale. Cette notion supporte une dérégulation d'un gène impliqué dans le développement normal d'un lignage cellulaire, ce que l'on appelle l'addiction au lignage, ou « lineage-addiction » et s'oppose à l'idée plus générale de l'activation dans la tumeur d'un signal cellulaire normalement absent dans le tissu normal correspondant et qui rend la tumeur dépendante de ce signal, ce que l'on appelle l'addiction à un oncogène, ou « oncogène-addiction » (Garraway and Sellers, 2006). Ainsi, un régulateur majeur d'un lignage cellulaire peut devenir un oncogène lorsque son expression est dérégulée. D'autres facteurs de transcription participant à la définition d'une identité tissulaire sont définis comme des « lineage-survival oncogenes » : MITF, un régulateur majeur du lignage mélanocytaire et oncogène dans les mélanomes ; Sox2, impliqué dans le développement normal de l'œsophage et oncogène dans les carcinomes œsophagiens et pulmonaires ; NKX2-1, un facteur de transcription à homéodomaine, important pour le développement du poumon et oncogène dans le carcinome pulmonaire (Bass et al., 2009; Garraway et al., 2005; Yamaguchi et al., 2012). Ce caractère permet de comprendre le rôle oncogénique de *Cdx2* dans les métaplasies intestinales : la surexpression de *Cdx2* est associée à un pouvoir oncogénique. Les « lineage-survival oncogenes » sont considérés comme d'excellents marqueurs de cancer (Vias et al., 2008). C'est le cas pour la protéine CDX2 qui est utilisée comme marqueur fiable d'identité intestinale d'une tumeur, peu importe où elle se situe.

La dualité de fonctions de *Cdx2* se retrouve donc également au sein d'un seul et même tissu, l'épithélium intestinal, et semble dépendre de son niveau d'expression : une perte est associée à une fonction de suppresseur de tumeur, alors qu'une amplification/surexpression conduit à un pouvoir oncogénique. La fonction d'une protéine ne semble donc pas figée mais peut évoluer en fonction de son niveau d'expression.

## 4. *Cdx2*, un oncogène

### A. Les partenaires de CDX2 dans les cellules leucémiques

La première question de ma thèse visait à comprendre comment *Cdx2* peut avoir un rôle de suppresseur de tumeur dans le côlon et être oncogénique dans la lignée hématopoïétique. Nous avons pu démontrer qu'un des moyens permettant d'avoir des fonctions opposées de CDX2 était une interaction avec des partenaires spécifiques dans la lignée colique.

Cependant, nous n'avons pas identifié de partenaires spécifiques de la lignée hématopoïétique et le mécanisme expliquant le mode d'action de CDX2, dans ce contexte, reste inconnu, si ce n'est le rôle activateur des *Hox* (Rawat et al., 2012).

Il sera donc très intéressant de rechercher des partenaires de CDX2 spécifiques de lignées leucémiques par la technique du TAP-Tag. Afin de mettre en évidence les gènes cibles spécifiques *Cdx2* dans ces lignées, un microArray peut être réalisé en comparant l'expression des gènes dans les lignées cellulaires cancéreuses coliques à celle des leucémiques, après induction ou inhibition de l'expression de *Cdx2*.

### B. Perte d'interaction entre CDX2 et KU70/80 dans les cellules leucémiques

Quant à l'absence d'interaction entre CDX2 et KU70/80 dans les lignées leucémiques, pour l'instant, elle reste sans explication sachant que KU70/80 s'exprime dans ces cellules. Plusieurs hypothèses peuvent être émises.

- La première est l'intervention d'une troisième protéine permettant de faire le lien entre CDX2 et KU70/80.
- La deuxième hypothèse est que d'autres protéines, présentes dans la lignée hématopoïétique, bloquent la fixation de CDX2 sur KU70, comme CDX2 le fait, par exemple, en interagissant avec la  $\beta$ -caténine l'empêchant ainsi de s'associer avec TCF4. Dans ce cas de figure, il serait alors intéressant de rechercher les partenaires de KU70/80 dans ces cellules en comparaison avec les cellules cancéreuses coliques, par la technique du TAP-Tag. Si une

interaction, présente uniquement dans la lignée hématopoïétique est mise en évidence, il sera alors possible de démontrer, si oui ou non, elle empêche la fixation de CDX2 en inhibant, par exemple, son expression par siARN ou en la surexprimant.

- Enfin, une troisième hypothèse met en avant les régulations post-traductionnelles de CDX2. En effet, ces dernières pourraient moduler les interactions de CDX2, et même de manière générale ses fonctions. Bien que je n'ai pas pu mettre en évidence un rôle de l'ADP-ribosylation ni de la phosphorylation des sérines dans sa partie C-terminale sur son action dans la réparation, il n'est pas impossible que d'autres sites de phosphorylation que ceux que j'ai testés, soient impliqués. En effet, la sérine S60, est un site de phosphorylation par Erk1/2 (Rings et al., 2001). De même, on ne peut pas exclure que d'autres modifications post-traductionnelles telles que l'acétylation ou la méthylation puissent moduler son activité. Une analyse, en parallèle dans les deux lignées cellulaires, du statut de CDX2 pour ces différentes modifications permettrait alors d'observer des différences pouvant conduire aux actions opposées de *Cdx2*.

### C. Modèles murins de perte/gain de fonction de *Cdx2* dans la lignée hématopoïétique

Afin d'étudier le rôle de *Cdx2* au cours de l'émergence des leucémies et pour développer un modèle plus physiologique que le modèle d'irradiation sublétales suivie de greffe de cellules souches hématopoïétiques surexprimant CDX2, nous avons entrepris l'étude d'un modèle murin de surexpression de *Cdx2* dans la lignée hématopoïétique. Nous disposons au laboratoire du modèle de surexpression inducible de *Cdx2* (souris Jojo-Cdx2, décrites dans le troisième article soumis joint à ce manuscrit, Vanier et al.). Ces souris ont été croisées avec des souris Mx1-Cre qui expriment la Cre recombinase dans les cellules souches hématopoïétiques (Jean-Pierre David, Erlangen, Allemagne). Malheureusement, nous n'avons pas pu mettre en évidence de surexpression de CDX2 dans les cellules souches hématopoïétiques CD34+. Ce modèle a montré ses limites puisque le promoteur utilisé dans le transgène Jojo-Cdx2 ne permet pas, contrairement à ce qui était espéré, une expression dans les cellules sanguines après défloxage. Un nouveau modèle de surexpression inducible a été développé plus récemment au laboratoire en insérant, dans le locus ROSA26, un transgène contenant l'ADNc codant pour CDX2, placé en aval d'une cassette STOP floxée. Ces souris sont utilisées actuellement pour étudier les conséquences de l'expression ectopique de *Cdx2* dans le

système digestif et seront prochainement croisées avec les souris Mx1-Cre pour évaluer les conséquences de la surexpression de *Cdx2* dans les cellules souches hématopoïétiques.

Parallèlement à ce travail, je me suis également intéressée à un sujet ayant trait au développement du système hématopoïétique. En effet, le gène *Cdx2* est capable de moduler la formation des progéniteurs hématopoïétiques (McKinney-Freeman et al., 2008). Or, les voies activées au cours de l'ontogenèse sont souvent des voies qui se réactivent au cours de l'oncogenèse. L'étude du rôle de CDX2 dans la mise en place du tissu sanguin pourrait nous mener vers une meilleure compréhension de son rôle dans l'émergence des leucémies aiguës. Nous avons entrepris de regarder le rôle de *Cdx2* au cours du développement du système sanguin dans un modèle d'inactivation conditionnelle dans la lignée hématopoïétique. Nous disposons au laboratoire des souris  $Cdx2^{Flox/Flox}$  (Stringer et al., 2012) que nous avons croisées avec les souris *c-fes*-Cre (Laurent Delva, Dijon). L'analyse des descendants a montré une létalité embryonnaire des doubles mutants aux alentours de E11. Malheureusement, nous avons perdu le phénotype de létalité embryonnaire, vraisemblablement suite à la perte de l'expression de la Cre-recombinase au fur et à mesure des générations, peut-être due à des modifications épigénétiques du transgène *c-fes*-Cre. Ces résultats préliminaires suggèrent un rôle important de CDX2 dans la formation d'un centre hématopoïétique fonctionnel.

## 5. CDX2, un régulateur du NHEJ

### A. Des facteurs de transcription régulateurs du NHEJ

CDX2 et HOXB7 ne sont pas les seules protéines qui, sans être des éléments du complexe nécessaire au NHEJ, le régulent. De plus en plus d'articles mettent en évidence le rôle de protéines dans la régulation de cette voie de réparation : le facteur de transcription c-Myc interagit avec KU70 inhibant son recrutement sur les cassures de l'ADN et donc le NHEJ (Li et al., 2012) ; SIRT1, une déacétylase, stimule la réparation en déacétylant KU70 (Jeong et al., 2007) ; Pem, un facteur de transcription à homéodomaine, quant à lui, stimule la réparation de l'ADN en activant l'expression des gènes de réparation (Wayne et al., 2002).

Ceci démontre que le NHEJ, tout comme les autres mécanismes de réparation, n'est pas uniquement sous le contrôle des protéines, que je qualifierais « d'effecteurs » (les protéines KU,

DNA-PK, Ligase IV, constituants à part entière du NHEJ), mais est soumis à un contrôle fin par des « régulateurs », qui interviennent ponctuellement en détournant leur fonction principale.

## B. Interaction directe de CDX2 avec les protéines KU ?

Nous avons pu mettre en évidence une inhibition du NHEJ par CDX2 et nous montrons une co-immunoprécipitation entre CDX2 et les protéines KU. Cependant, les co-immunoprécipitations révèlent la présence de deux protéines dans un même complexe mais ne permettent pas de mettre en évidence une interaction directe entre ces protéines. Un autre facteur présent dans ce complexe peut faire le lien entre les deux protéines. Ce facteur pourrait alors être absent de la lignée hématopoïétique, ce qui empêcherait la formation du complexe dans cette lignée. La technique de PLA (Proximity Ligation Assay) est une technique qui permet de mettre en évidence l'interaction entre deux protéines par immunofluorescence. Elle s'apparente, en quelque sorte, à la technique du FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer), cependant elle est beaucoup moins sensible puisqu'elle permet de détecter une interaction entre deux éléments distants jusqu'à 40nm contre 10nm pour le FRET et ne permet donc pas d'exclure la présence d'une troisième protéine. L'utilisation du FRET serait alors un meilleur outil. Dans la lignée leucémique, un éventuel troisième partenaire pourrait également être recherché en immunoprécipitant le complexe puis en séparant les différents composants sur un gel et en le colorant au nitrate d'argent, par exemple, il serait alors possible de montrer sa présence. Il pourrait ensuite être identifié par spectrométrie de masse.

## C. CDX2 et les autres mécanismes de réparation de l'ADN

Nous avons montré que CDX2 inhibe mais ne supprime pas la réparation des cassures doubles brins de l'ADN. Etant donné que CDX2 et les protéines KU interagissent, nous avons conclu à une inhibition du mécanisme de C-NHEJ. Cependant, d'autres mécanismes de réparation des cassures double-brins de l'ADN existent : le HR et le NHEJ alternatif (B-NHEJ). Le choix de l'une ou l'autre voie est finement régulé, notamment par KU et PARP3 (Beck et al., 2014; Fattah et al., 2010). Par exemple, en inhibant l'expression de *Ku70* avec un siARN dans des cellules HCT116, le mécanisme C-NHEJ, normalement majoritaire dans ces cellules, est bloqué et le B-NHEJ activé (Renouf et al., 2012). L'un prend le relais de l'autre.

Cdx2 agit-elle sur les trois mécanismes ? L'activité résiduelle de réparation correspond-elle à l'une ou l'autre forme de réparation ?

Le NHEJ alternatif est un mécanisme de réparation ne faisant pas appel aux protéines KU70/80 ni à la DNA-PKcs mais à la PARP1. Il est donc envisageable que CDX2 régule aussi le B-NHEJ, notamment au travers de son interaction avec des protéines impliquées dans le B-NHEJ. J'ai démontré que CDX2 pouvait interagir avec PARP1 et être ADP-ribosylée, cependant je n'ai pas pu mettre en évidence, pour l'instant, une quelconque fonction de cette modification, ni sur son activité transcriptionnelle, ni sur son activité dans la réparation. Etant donné que CDX2 inhibe globalement la réparation des cassures double-brins d'ADN, et pour rester en concordance avec l'idée que CDX2 inhibe la réparation pour favoriser l'apoptose, mon hypothèse serait que CDX2 inhibe également cette voie. Il existe un plasmide permettant de distinguer ces deux mécanismes : le pDVG94 (Fattah et al., 2010). Ce plasmide est construit de telle sorte que la réparation de la coupure enzymatique, si elle se fait par le B-NHEJ, engendre l'apparition d'un site de coupure pour l'enzyme de restriction BstXI. Ainsi, après amplification de la zone de réparation puis digestion par BstXI, le B-NHEJ génère un fragment de 120 pb alors que le C-NHEJ en donne un de 180 pb. Nous disposons déjà de ce plasmide au laboratoire, cependant le protocole nécessite encore des mises au point pour pouvoir fonctionner dans nos conditions.

Pour ce qui est du HR, nous pourrions supposer que si CDX2 le modulait, ce serait en le stimulant, puisque contrairement au NHEJ, ce mécanisme de réparation est fidèle. Il est également possible de ségréger ces deux voies grâce à un plasmide : le SSR (See-Saw Reporter) (Gomez-Cabello et al., 2013). Il contient la séquence de la RFP interrompue par celle de la GFP. L'enzyme Scel coupe le plasmide après la GFP. Si cette coupure est réparée par le NHEJ, la GFP s'exprimera. En revanche si c'est le HR, il va permettre de reconstituer la séquence de la RFP en éliminant celle de la GFP. Ainsi en mesurant l'émission de fluorescence verte comparée à la fluorescence rouge, il est possible de quantifier l'activité des deux mécanismes. Nous possédons également ce plasmide, cependant les premières expériences ne sont pas concluantes et nécessitent également des mises au point.

## 6. CDX2, HOXB7 et PBX

Les protéines HOX et CDX2 ont en commun un homéodomaine extrêmement conservé et pourtant ils exercent tous les deux des fonctions opposées. Pour les protéines HOX, la spécificité de liaison à l'ADN peut être modulée par leur hétérodimérisation avec des protéines de la famille TALE, comme PBX, MEIS ou PREP. Un motif YPWM situé en N-terminal de l'homéodomaine et conservé

dans plusieurs protéines HOX est impliqué dans l'hétérodimérisation des HOX avec PBX (Mann and Affolter, 1998).

Curieusement, la protéine CDX2 possède un motif semblable en amont de son homéodomaine. J'ai cherché à voir si ce motif pouvait altérer l'effet de Cdx2 sur la réparation. Les dernières expériences réalisées au cours de ma thèse, montrent que l'activité inhibitrice de CDX2 est affectée par la mutation du son site de fixation à PBX. La mutation du tryptophane et de la méthionine de cet hexapeptide, en alanine, entraîne une perte de l'effet inhibiteur de CDX2 sur la réparation. Cette mutation aurait pour conséquence la perte de l'interaction avec les PBX (Knoepfler and Kamps, 1995) (ceci n'a pas été vérifié pour CDX2). A l'inverse, le changement de l'hexapeptide en celui de HOXB7 rend CDX2 stimulateur de la réparation. Les mutations sur HOXB7 ne modifient pas son activité stimulatrice. Ceci laisse donc supposer un rôle des PBX sur l'activité réparatrice de CDX2. Cependant, tout comme pour les mutants chimériques et de délétions, il faut être prudent quant à l'analyse des résultats. En effet ces protéines sont transformées dans leurs séquences en acides aminés, et ceci peut avoir des répercussions sur leur structure tridimensionnelle et par conséquent sur leur fonction, non pas dus à la perte d'un domaine important pour cette fonction mais plutôt dues à la modification de leur structure tridimensionnelle. La perte de fonction du mutant Cdx2-WM-AA ne permet pas d'affirmer que PBX joue un rôle indispensable dans l'action de CDX2. En revanche, le gain de fonction du mutant Cdx2-Hexa-H7 le laisse fortement supposer.

C'est pourquoi, il serait intéressant d'identifier les protéines TALE qui interagissent avec CDX2 et HOXB7, de déterminer si les mutations du motif WM affectent ces interactions et de voir si ces protéines modifient la spécificité de liaison à l'ADN de CDX2 et HOXB7.

Une différence de partenaire de PBX pourrait expliquer les rôles opposés de CDX2 et HOXB7 sur la réparation de l'ADN mais pourrait également correspondre à ce troisième partenaire absent de la lignée hématopoïétique qui permettrait d'avoir des fonctions opposées de CDX2 dans les deux lignées cellulaires.

## MATERIELS ET METHODES

---



Dans cette partie, je décris plus en détails certaines méthodes que j'ai été amenée à mettre au point au cours de ma thèse, ainsi que la construction des différents plasmides que j'ai réalisés.

## Chapitre I : Matériels

### 1. Anticorps

Liste des anticorps utilisés pour les expériences développées dans ce Matériels et Méthodes.

Antigène	Fabriquant	Espèce	N° clone
Flag	Sigma	Souris	F3165
HA	Sigma	Lapin	H6908
IgG de souris	Santa Cruz	Souris	Sc2025
IgG de rat	Santa Cruz	Rat	Sc2026

### 2. Plasmides

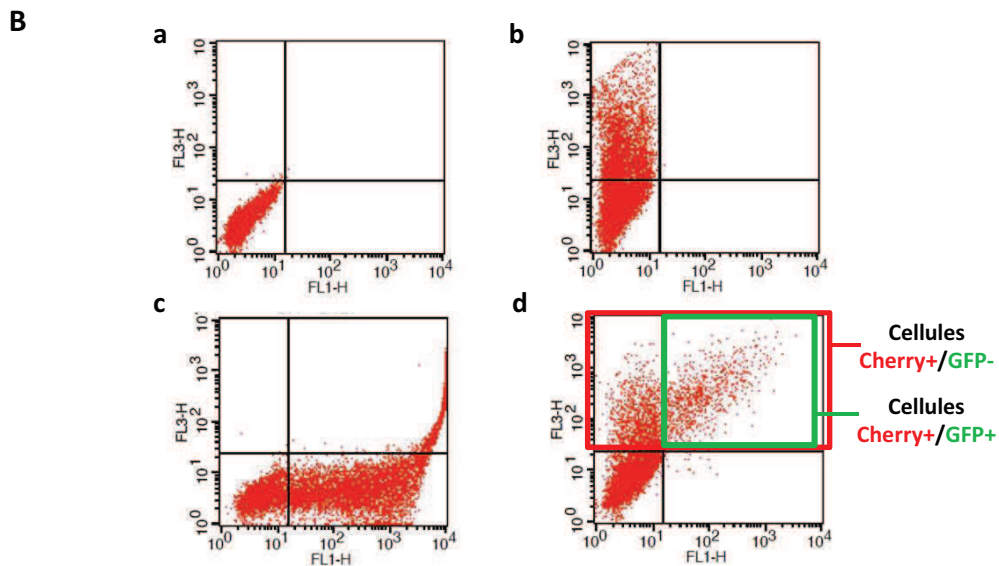
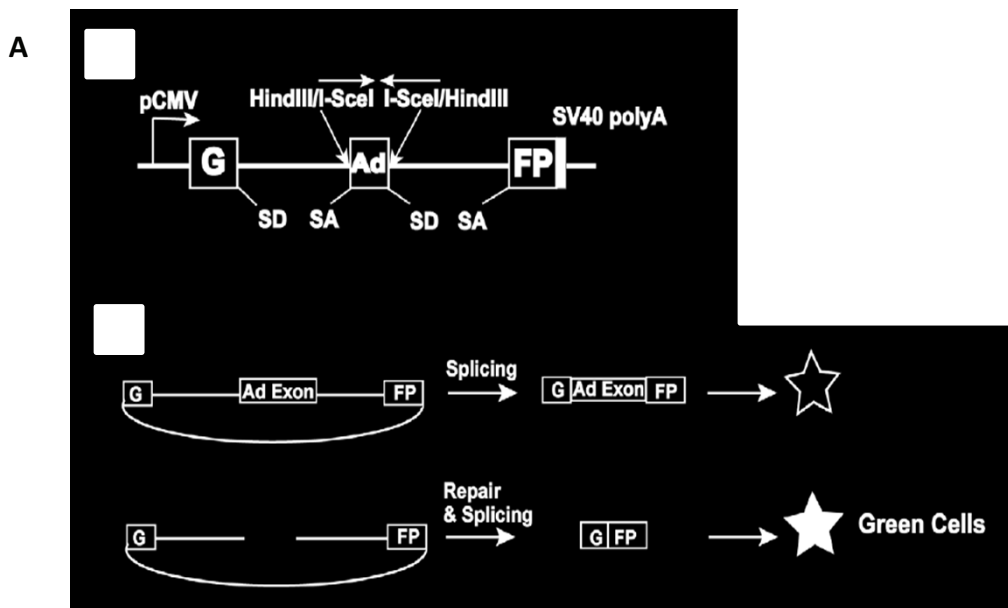
Liste des plasmides utilisés pour les expériences développées dans ce Matériels et Méthodes.

Plasmide	Origine
pcDNA3-Flag-hHoxb7	S. Park
pFlag-CMV2-hCdx2	Laboratoire
pCB6-HA-hCdx2	Laboratoire
pEGFP-Pem1-Ad2	G. Iliakis
pCherry	Clontech
pTCBS	V. Zappavigna
pFlag	Sigma
pRLnull	Promega
pGI3-contrôle	Promega
pcDNA3	Invitrogen

### 3. Oligonucléotides

Liste des oligonucléotides utilisés pour les expériences développées dans ce Matériels et Méthodes et les clonages que j'ai réalisés.

Nom	Séquence (5' vers 3')	Utilisation
pTCBS-F	CTCAGATCCAAGCTTGTCTGA	RT-qPCR
pTCBS-R	TTCGAATTCGCCAATGACAAGA	RT-qPCR
hCdx2-4SE-F	GAGCCCTTGGAACCGGTGTCTGAAGTCAAGCCGAAAGTGCCTGGCGAAGTCCCTGGG	Clonage
hCdx2-4SE-R	CCCAGGGACTTCGCCAGGCACTTCGGCTTGCAAGTTCAGACACCGGTTCCAAGGGCTC	Clonage
hCdx2-4SA-F	GAGCCCTTGGCTCCGGTGTCTGCCCTGCAAGCCGAGTGCCTGGCGCTGTCCCTGGG	Clonage
hCdx2-4SA-R	CCCAGGGACAGCGCCAGGCACTGCGGCTTGCAAGGACAGACACCGGAGCCAAGGGCTC	Clonage
hCdx2-AfeI-F	AAATCAACAAGAAAGCGCTGCAGCAGCAACAG	Clonage
hCdx2-AfeI-R	CTGTTGCTGCTGCAGCGCTTCTTGTGATTT	Clonage
hCdx2-AflII-F	GCGCAGCAGTCCCTCTTAAGCCAAGTAAAACC	Clonage
hCdx2-AflII-R	GGTTTTCACTTGGCTTAAGAGGGACTGTGCGC	Clonage
hHoxb7-AfeI-F	GGAGAACAAGACAGCGCTCCCGGGACCAC	Clonage
hHoxb7-AfeI-R	GTGGTCCCCGGGAGCGCTGTCTTGTCTCC	Clonage
hHoxb7-AflII-F	GGATGCGAAGTCTCTTAAGTACCAGCAAACGA	Clonage
hHoxb7-AflII-R	TCGTTTGCGGTCACTTAAGGAGTTCGCATCC	Clonage
hHoxb7-198-XbaI	AAATCTAGATCACTTGTCTCCTTTTCCACTTCATGC	Clonage
hHoxb7-218-XbaI	AAATCTAGATCACTTCTCTCTCTCTCTGCTTCAG	Clonage
hHoxb7-1-HindIII	AAAAAGCTTGATAAGGATCCATGGACTACAAGACGATGACGATAAAGAATTC	Clonage
hHoxb7-134-HindIII	AAAAAGCTTGATAAGGATCCATGGACTACAAGACGATGACGATAAAGGAAGTACCGCAAACGAGGCCGCCA	Clonage
hHoxb7-170-XbaI	AAATCTAGATCAGATCTCGATGCGCCGCCGCCGCTCAG	Clonage
hCdx2-176-HindIII	AAAAAGCTTCCCTCGGCAGCCAAGTAAA	Clonage
hCdx2-249-XbaI	TTTTCTAGAGCAACTTCTTGTGATTTTCC	Clonage
hCdx2-282-XbaI	TTTTCTAGATCAAGGCTCTGGGCACTTC	Clonage
hCdx2-313-XbaI	TTTTCTAGATGCCGCTGCAGAACCCGGT	Clonage
hCdx2-R237A-F	CTGGTTTCAGAACCAGCGCAGCAAAGGAGAGG	Clonage
hCdx2-R237A-R	CCTCTCCTTTGCTGCGCGGTTCTGAAACCAG	Clonage
hCdx2-R237P-F	CTGGTTTCAGAACCAGCCAGCAAAGGAGAGG	Clonage
hCdx2-R237P-R	CCTCTCCTTTGCTGGGCGGTTCTGAAACCAG	Clonage
hHoxb7-R189A-F	GGTTTCAGAACCAGGCCATGAAGTGGAAAAAGG	Clonage
hHoxb7-R189A-R	CCTTTTCCACTTCATGGCCCGTTCTGAAACC	Clonage
hHoxb7-R189P-F	GGTTTCAGAACCAGGCCATGAAGTGGAAAAAGG	Clonage
hHoxb7-R189P-R	CCTTTTCCACTTCATGGCCCGTTCTGAAACC	Clonage
hCdx2-WM-AA-F	GAACCTGTGCGAGGCGCGCGGAAGCCGGCG	Clonage
hCdx2-WM-AA-R	CGCCGGCTTCCGCGCCGCTCGCACAGTTTC	Clonage
hHoxb7-WM-AA-F	CCGGATCTACCCGCGCGCGAAGCTCAGGA	Clonage
hHoxb7-WM-AA-R	TCCTGAGCTTCGCGCCGCGGGTAGATCCGG	Clonage
hCdx2-Hexa-H7-F	CCAGCGGCGGAACATATACCCGTGGATGCGGAAGC	Clonage
hCdx2-Hexa-H7-R	GCTTCCGCATCCACGGGTATATGTTCCGCCGCTGG	Clonage
hHoxb7-Hexa-C2-F	GAGTAACTCCGGCTCTGCAATGGATGCGAAGCT	Clonage
hHoxb7-Hexa-C2-R	AGCTTCGCATCCATTCGAGAGCCGGAAGTTACTC	Clonage



**Figure 52. Système rapporteur de l'activité de réparation des cassures de l'ADN.**

Le plasmide pEGFP-Pem1-Ad2 (A) est composé de la séquence codante de la GFP interrompue par un intron contenant un exon de l'Adénovirus. Cet exon est encadré par des sites de restriction pour HindIII. La coupure par HindIII sert à éliminer l'exon et à simuler une cassure de l'ADN. Si la réparation est activée dans la cellule, alors la protéine GFP pourra s'exprimer et la cellule fluorescera en vert (Fattah et al., 2010).

Pour déterminer les différents cadrans (B), des points contrôles sont réalisés pour pouvoir délimiter les différentes zones. Les cellules noires (a) sont uniquement transfectées avec le vecteur pFlag, les cellules rouges (b) sont Cherry positives (Cherry+), les cellules vertes (c) sont transfectées par un vecteur GFP classique (GFP+). L'activité de réparation peut ensuite être calculée : elle correspond à la population de cellules Cherry+/GFP+ par rapport à celle Cherry+/GFP-. FL3-H : intensité de fluorescence de la Cherry ; FL1-H : GFP.

## Chapitre II : Méthodes

### 1. Analyses de la réparation de l'ADN

Le principe du test de réparation est de soumettre un ADN plasmidique, linéarisé par enzyme de restriction, au système de réparation cellulaire. La coupure de l'ADN par l'enzyme mime une cassure double brin qui sera prise en charge par le mécanisme de réparation. La séquence plasmidique sera alors ainsi reconstituée soit par la recircularisation du vecteur soit par assemblage de deux ou plusieurs vecteurs à la suite en multimère.

#### A. La réparation de l'ADN *in vivo*

##### a. Analyse par FACS

Cette technique a été décrite par Fattah (Fig. 52A) (Fattah et al., 2010) . Elle emploie un plasmide modifié codant pour la GFP, pEGFP-Pem1-Ad2. Dans ce plasmide, la séquence codante de la GFP est interrompue par un intron contenant un exon de l'Adénovirus. Cet exon est encadré par des sites de restriction pour HindIII. Le plasmide, tel quel, code pour une protéine GFP non-fonctionnelle due à la présence de l'exon. Afin de soumettre ce plasmide à la machinerie de réparation de la cellule, il est digéré par l'enzyme HindIII qui élimine alors l'exon d'Adénovirus. Cet exon permet d'exclure de faux positifs liés à la présence de vecteur non digéré. La linéarisation du plasmide par enzyme de restriction permet de mimer une cassure double brin de l'ADN qui sera alors prise en charge par le système de réparation. Si la réparation est activée dans la cellule alors la séquence de la GFP sera reconstituée et exprimée. La cellule émettra une fluorescence verte. Afin de normaliser les résultats, un vecteur codant pour la Cherry est co-transfecté. L'activité de réparation est obtenue en mesurant par cytométrie en flux (FACS) la quantité de cellules vertes et rouges (réparation active) par rapport aux cellules uniquement rouges (réparation inactive).

Le vecteur pEGFP-Pem1-Ad2 est digéré par HindIII (New England Biolab) puis purifié sur colonne du kit QIAquick PCR Purification (Qiagen). Les cellules sont transfectées par le Jet PEI (Polyplus Transfection) avec la combinaison de plasmides suivante :

Plasmide	Quantité/puits
pEGFP-Pem1-Ad2/HindIII	10ng
pCherry	10ng
Plasmide d'intérêt	800ng

Quarante-huit heures après transfection, les cellules sont trypsinisées puis analysées en FACS (FACScalibur, BD Biosciences). Les résultats sont analysés en mesurant la fluorescence rouge et verte et représentés sur un graphique (intensité rouge en fonction de l'intensité verte). Les cellules dont la réparation est active sont rouges et vertes et se situent donc dans le quadrant droit du haut du graphique (Fig. 52B). Le pourcentage de cellules réparées correspond au nombre de cellules rouges et vertes sur le nombre total de cellules rouge. Les cadrans sont mis en place grâce à des points de contrôles : des cellules transfectées uniquement avec le vecteur vide pFlag permettent de déterminer les cellules « noires », celles transfectées avec le vecteur pCherry permettent de définir les cellules « rouges ». Afin d'identifier les cellules « vertes », les cellules sont transfectées avec le vecteur pEGFP.

### b. Analyse par Luciférase

Une alternative à l'analyse par FACS est d'utiliser des plasmides codant pour la luciférase. L'avantage de ce système permet de faire de plus grandes séries avec différentes conditions et en duplicat ou triplicat.

Pour cela, le plasmide codant pour la luciférase, sous le contrôle d'un promoteur CMV, est utilisé comme rapporteur de l'activité de réparation. En effet, ce plasmide est linéarisé par une enzyme de restriction entre le promoteur et l'ATG, ainsi, la luciférase ne s'exprimera que si le plasmide est réparé par la machinerie cellulaire. L'activité de la luciférase sera donc proportionnelle à l'activité de réparation de la cellule. Cette activité est normalisée par l'activité de la luciférase Rénilla codé par le plasmide pRLnull

Le vecteur pGI3-contrôle, dont la luciférase est sous le contrôle d'un promoteur CMV, est soumis à digestion enzymatique par HindIII puis purifié sur colonne QIAquick PCR Purification. La linéarisation peut être vérifiée sur gel d'agarose. La quantité d'ADN linéaire est mesurée en prenant la densité optique à l'aide du Nanodrop 1000 (Thermo Scientific).

Les cellules HCT116 sont mises en culture dans des plaques 24 puits à raison de  $1,5 \times 10^5$  cellules par puits. Ces cellules sont transfectées par le transfectant Jet PEI (Polyplus Transfection) avec  $1\mu\text{g}$  par puits d'ADN composé d'une combinaison des différents plasmides comme suit :

Plasmide	Quantité/puits
pRLnull	10ng
pGI3-contrôle/HindIII	250ng
Plasmide d'intérêt	Xng*
pFlag	q.s.p. $1\mu\text{g}$

\*le ou les plasmides d'intérêt correspondent aux plasmides codant pour les protéines à tester sur l'activité de réparation, de manière générale, les gammes transfectées sont de 10, 50 et 500ng, en combinaison ou non avec un autre plasmide d'intérêt.

Quarante-huit heures après transfection, l'activité de la luciférase et de la Rénilla est mesurée grâce au kit Dual Report Luciferase Assay (Promega) avec le luminimètre Lumistar (BMG). L'activité de la luciférase est normalisée par celle de la Rénilla puis rapportée à celle de la condition contrôle, sans plasmide d'intérêt.

Afin de s'assurer que l'activité luciférase observée est bien relative à celle de réparation et non due à une stimulation de l'activité transcriptionnelle du promoteur du vecteur pGI3-contrôle par les plasmides d'intérêts, le pGI3-contrôle non digéré par HindIII est co-transfecté avec les différents plasmides d'intérêts et l'activité luciférase est mesurée.

## B. La réparation de l'ADN *in vitro*

J'ai adapté les protocoles décrits dans les articles de Pastwa et de Perrault (Pastwa et al., 2001; Perrault et al., 2004). Cette troisième technique d'analyse de l'activité de réparation des cassures de l'ADN se réalise *in vitro* et se base également sur la réparation d'un plasmide linéarisé en présence d'un extrait nucléaire. Si le mécanisme de réparation est activé, alors les extrémités libres du plasmide seront reconnues comme des cassures de l'ADN. La réparation de celles-ci entraîne la circularisation ou la multimérisation de plusieurs plasmides et donc l'apparition de multimères. Ces derniers peuvent être observés sur un gel d'agarose par la formation de plusieurs bandes de tailles

variables. L'activité de réparation s'évalue alors par la mesure de l'intensité des différentes bandes de multimères par rapport à celle du plasmide linéaire.

Afin d'optimiser la migration des multimères sur gel d'agarose, il est préférable de choisir un plasmide de petite taille, j'ai donc opté, parmi les plasmides présents au laboratoire, pour le pRLnull d'une taille de 3,3Kb. D'après Perrault, la coupure ADN la mieux prise en charge par le système de réparation est celle effectuée par Sall, je digère donc le pRLnull par Sall.

#### a. Extraction nucléaire

Les cellules HCT116 ( $1,5 \times 10^6$  cellules/points) sont transfectées à l'aide du Jet Prime (Polyplus) avec le plasmide d'intérêt. Après 48h, les cellules sont rincées au PBS puis reprises dans 4 volumes de tampon de lyse hypotonique froid (10mM Tris-HCl pH 7.6, 1mM DTT, 5mM  $MgCl_2$ , 1mM EDTA, inhibiteur de protéases (Roche)). Après 40min d'incubation dans la glace, les cellules sont lysées mécaniquement à l'aide d'un Douncer. Le lysat est ajusté à 250mM de sucrose puis centrifugé 5min à 1000g afin d'isoler les noyaux. Ces derniers sont resuspendus dans 4 volumes de tampon d'extraction nucléaire (20mM Tris-HCl pH 7.6, 1mM DTT, 2mM EDTA, 20% glycérol, 500mM NaCl, inhibiteur de protéases) puis incubés 30 min dans la glace. L'extrait est ensuite clarifié par centrifugation pendant 30min à 21000g. Le surnageant est dialysé pendant une nuit contre le tampon de dialyse (20mM Tris-HCl pH 7.6, 1mM EDTA, 1mM DTT, 20% glycérol, 25mM NaCl, 0,2mM PMSF).

#### b. Test de réparation

Le vecteur pRLnull est digéré par Sall puis purifié sur colonne QIAquick PCR Purification (Qiagen). Deux cent cinquante ng de plasmide linéaire sont soumis à réparation en présence de 20 $\mu$ g d'extrait nucléaire dans le tampon de réparation (20mM Tris-HCl pH 7.6, 10mM  $MgCl_2$ , 80mM KCl, 1mM ATP, 1mM DTT, inhibiteur de protéases) pendant 1h à 25°C. La réaction est stoppée par l'ajout de 1 $\mu$ l de SDS 10%, 1 $\mu$ l de Protéinase K 10mg/ml et 2 $\mu$ l d'EDTA 0,5mM et une incubation à 37°C pendant 1h. L'ADN est ensuite purifié au phénol-chloroforme puis séparé par électrophorèse sur gel au BET à 0,7% d'agarose pendant 4h. L'intensité des bandes est mesurée à l'aide du logiciel ImageJ et le pourcentage de réparation correspond au rapport entre l'ensemble de l'intensité des multimères et l'intensité de la bande correspondante au plasmide linéaire, non réparé.

## 2. Immunoprécipitation de la chromatine (ChIP)

Cette technique permet de mettre en évidence la fixation d'une protéine sur une séquence d'ADN donnée. Au cours de ma thèse, j'ai employé cette technique afin de mettre en évidence un impact de CDX2 sur la fixation de HOXB7 sur des séquences promotrices cibles. Cependant, des expériences préliminaires n'ont pas permis de mettre en évidence une modulation d'un gène cible connu de HOXB7 (FGF2). Nous avons donc décidé d'opter pour le plasmide pTCBS. En effet, ce plasmide, qui est un rapporteur luciférase de l'activité des gènes *Hox*, possède au niveau du promoteur une séquence consensus de fixation pour les homéodomaines. Les oligonucléotides pour le ChIP ont été choisis de façon à encadrer cette région promotrice et testés pour vérifier leur efficacité. Pour cette technique, j'ai utilisé le kit Magna CHIP G (Millipore).

Les cellules HCT116 sont transfectées à l'aide du Jet Prime avec un ratio de 1 pour la protéine d'intérêt n°1, 1 pour la protéine d'intérêt n°2 et 0,75 de pTCBS. Après 48h de transfection, les protéines sont fixées à l'ADN par le formaldéhyde 1% dans le milieu de culture pendant 10min, puis le formaldéhyde est neutralisé 10min par de la glycine 125mM. Après lavages au PBS, le culot cellulaire est repris dans le Cell Lysis Buffer à raison de 50µl pour 10<sup>6</sup> cellules puis centrifugé pour précipiter les noyaux. Le culot de noyaux est resuspendu dans le tampon Nuclear Lysis Buffer (50µl pour 10<sup>6</sup> cellules) puis soniqué afin d'obtenir des fragments d'ADN de 200 à 1000pb, à l'aide du Bioruptor (Diagenode) pendant 12min à forte intensité pour les HCT116.

Chaque ChIP est réalisé sur 50µl de chromatine avec 450µl de ChIP dilution Buffer, 20µl de billes magnétiques et 1µg d'anticorps (anti-Flag, anti-HA et IgG de souris ou de rat). L'ensemble est incubé une nuit à 4°C en rotation. Les billes sont ensuite lavées puis incubées avec le tampon Elution Buffer et la protéinase K afin de récupérer uniquement la chromatine, pendant 2h à 62°C. La protéinase K est ensuite inactivée pendant 10min à 95°C. L'ADN est purifié sur des colonnes QIAquick PCR Purification (Qiagen) puis élué dans 35µl de tampon d'éluion. La quantité d'ADN présente est évaluée par PCR semi-quantitative (Applied biosystem) en Sybr Green (Roche) sur 2µl de ChIP avec les oligonucléotides pTCBS-F et pTCBS-R.

Les résultats sont représentés en %Input qui correspond à l'enrichissement en chromatine des ChIP comparé au contrôle non-immunoprécipité. Les calculs utilisés pour analyser les résultats de la PCR sont les suivants :

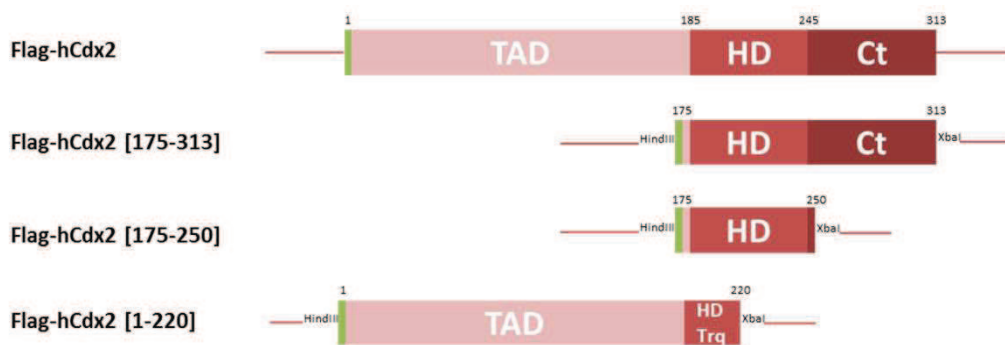
$$\%Input = AE^{(Ct_{InputCor} - Ct_{CHIP})} \times 100$$

AE = efficacité d'amplification mesurée lors du test de l'efficacité des oligonucléotides

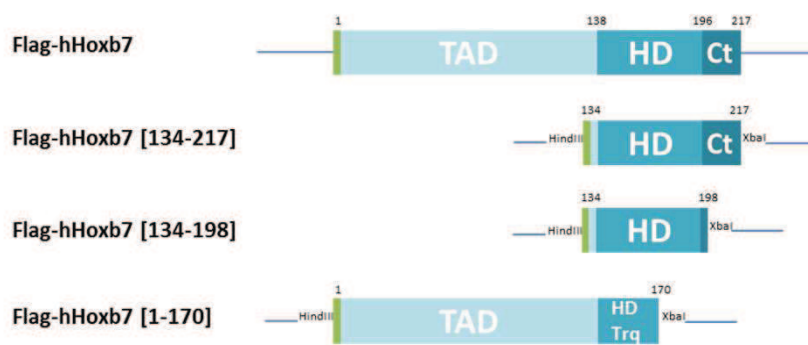
$Ct_{InputCor} = Ct - \text{Log}_2(\text{Facteur dilution}) = Ct - \text{log}_2(100) = Ct - 6,64$



**A**



**B**



**Figure 53. Mutants de délétion.**

Représentation schématique des différents mutants de délétion de CDX2 (A) et HOXB7 (B). Les nombres représentent la numérotation des acides aminés. TAD : Domaine de Transactivation. HD : Homéodomaine. Ct : C-terminale. Trq : tronqué

### 3. Clonages

#### A. Les mutants de délétion

Les protéines homéotiques CDX2 et HOXB7 sont constituées de trois parties, le domaine de transactivation en N-terminale (TAD), un homéodomaine au centre (HD), et une partie C-terminale (Ct). Afin de tester l'impact de ces différentes parties sur les fonctions de ces protéines, j'ai réalisé des plasmides codant pour des mutants de délétions (Fig. 53).

Les mutants de délétion sont clonés dans le vecteur pcDNA3 à partir du plasmide pFlag-CMV2-hCdx2 ou pcDNA3-Flag-hHoxb7 via les sites de restriction HindIII et XbaI. Pour cela, les fragments d'intérêts sont amplifiés par PCR à l'aide d'oligonucléotides spécifiques. Les oligonucléotides en 5' contiennent une séquence homologue au début du fragment à amplifier, l'étiquette Flag et le site de restriction pour HindIII. Ceux en 3' sont homologues à la fin du fragment à amplifier et possèdent le site de restriction pour XbaI. L'amplification se fait à l'aide de la polymérase *pfx* ultra (Invitrogen).

Mutant	Oligonucléotides (5' - 3')	Domaine de		Domaine
		Transactivation (TAD)	Homéodomaine (HD)	C-terminale (Ct)
<b>Flag-hCdx2 [175-313]</b>	hCdx2-175-HindIII hCdx2-313-XbaI	-	✓	✓
<b>Flag-hCdx2 [175-250]</b>	hCdx2-175-HindIII hCdx2-250-XbaI	-	✓	-
<b>Flag-hCdx2 [1-220]</b>	hCdx2-1-HindIII hCdx2-220-XbaI	✓	Tronqué	-
<b>Flag-hHoxb7 [134-217]</b>	hHoxb7-134-HindIII hHoxb-217-XbaI	-	✓	✓
<b>Flag-hHoxb7 [134-198]</b>	hHoxb7-134-HindIII hHoxb-198-XbaI	-	✓	-
<b>Flag-hHoxb7 [1-170]</b>	hHoxb7-1-HindIII hHoxb-170-XbaI	✓	Tronqué	-

Les fragments amplifiés sont digérés par HindIII et XbaI de même que pcDNA3 puis purifiés sur colonne QIAquick PCR Purification. Enfin les fragments sont reliés par la T4 DNA ligase (Biolabs).

<b>hCdx2-WT</b>	871	-tggtttcagaaccgcagagcaaaggagagg-
	233	-W F Q N R R A K E R -
<b>hCdx2-R237P</b>	871	-tggtttcagaaccgc <b>cc</b> agcaaaggagagg-
hCdx2-R237P-F/R	233	-W F Q N R <b>P</b> A K E R -
<b>hCdx2-R237A</b>	871	-tggtttcagaaccgc <b>gc</b> agcaaaggagagg-
hCdx2-R237P-F/R	233	-W F Q N R <b>A</b> A K E R -

---

<b>hHoxb7-WT</b>	653	-tggtttcagaaccggcgcgatgaagtggaaa-
	233	-W F Q N R R M K W K -
<b>hHoxb7-R189P</b>	653	-tggtttcagaaccggc <b>cc</b> atgaagtggaaa-
hHoxb7-R189P-F/R	233	-W F Q N R <b>P</b> M K W K -
<b>hHoxb7-R189A</b>	653	-tggtttcagaaccgg <b>gc</b> atgaagtggaaa-
hHoxb7-R189P-F/R	233	-W F Q N R <b>A</b> M K W K -

**Figure 54. Mutants ponctuels.**

Séquences des acides nucléiques et aminés des mutants ponctuels. En rouge sont identifiés les acides nucléiques mutés et les acides aminés changés. Les oligonucléotides utilisés sont notés sous le nom du plasmide. Les nombres correspondent à la position de la première base ou du premier acide aminé.

## B. Les mutants ponctuels

La mutation de l'acide aminé 237, une arginine, de CDX2 en une proline engendre la perte de son activité transcriptionnelle ainsi que son effet inhibiteur sur la prolifération (Aoki et al., 2011). Afin de tester la conséquence de cette mutation dans la réparation de l'ADN, j'ai généré les deux mutants, R237P et R237A, à l'origine créé par Aoki, par mutagenèse dirigée (kit QuickChange II XL Site, Agilent). Ces arginines font partie d'une séquence conservée de l'homéodomaine entre CDX2 et HOXB7. J'ai également pu réaliser les mutants équivalents pour HOXB7, R189P et R189A (Fig. 54).

## C. Les mutants chimériques

Les mutants chimériques sont composés des TAD, HD et Ct provenant de CDX2 et/ou HOXB7 (Fig. 55). Afin de pouvoir couper la séquence des différents domaines, des sites de restriction sont insérés par mutagenèse dirigée (kit QuickChange II XL Site, Agilent) dans la séquence du plasmide pFlag-CMV2-hCdx2 et pcDNA3-Flag-hHoxb7. Un site AflIII est inséré entre le TAD et le HD et un site AfeI entre le HD et le Ct, par mutation silencieuse (le nouveau codon code pour le même acide aminé) ou par mutation faux sens (le nouveau codon code pour un autre acide aminé) mais dont le nouveau codon code pour un acide aminé de la même famille que celui qu'il remplace.

Une fois les sites de restriction insérés, les plasmides sont digérés par un couple d'enzymes de restriction suivant les domaines souhaités, NdeI (naturellement présent dans la séquence du CMV), AfeI et/ou AflIII. Puis les différents éléments sont reliés par la T4 DNA ligase (Biolabs).

Mutant	Sites de restriction	Domaine de		Domaine
		Transactivation (TAD)	Homéodomaine (HD)	C-terminale (Ct)
<b>F-B7<sup>Nt+HD</sup>C2<sup>Ct</sup></b>	NdeI - AfeI	HOXB7	HOXB7	CDX2
<b>F-C2<sup>Nt+HD</sup>B7<sup>Ct</sup></b>	NdeI - AfeI	CDX2	CDX2	HOXB7
<b>F-B7<sup>Nt</sup>C2<sup>HD+ Ct</sup></b>	NdeI - AflIII	HOXB7	CDX2	CDX2
<b>F-C2<sup>Nt</sup>B7<sup>HD+ Ct</sup></b>	NdeI - AflIII	CDX2	HOXB7	HOXB7
<b>F-B7<sup>Nt+Ct</sup>C2<sup>HD</sup></b>	AflIII - AfeI	HOXB7	CDX2	HOXB7
<b>F-C2<sup>Nt+Ct</sup>B7<sup>HD</sup></b>	AflIII - AfeI	CDX2	HOXB7	CDX2

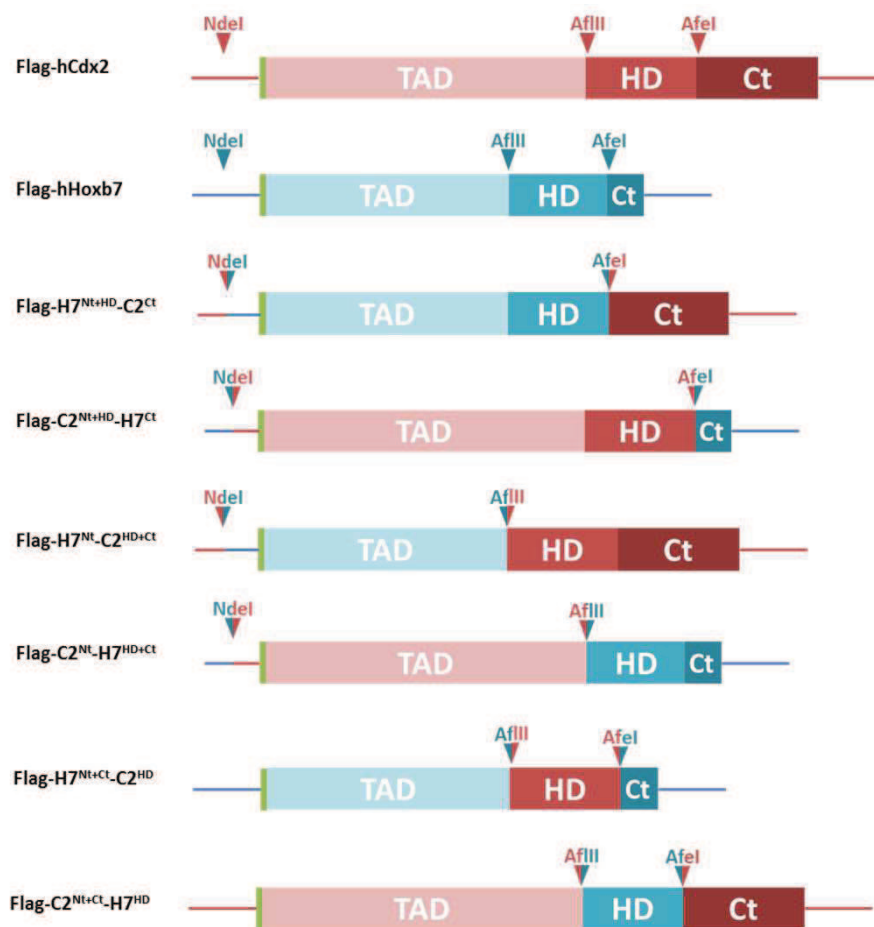
A

<b>hCdx2-WT</b>	700 -tcctcggcagccaa-	<b>hCdx2-WT</b>	910 -aagaagaagttgcag-
	176 -S L G S Q -		247 -K K K L Q -
<b>hCdx2-AfIII</b>	700 -tcctc <b>cttaag</b> ccaa-	<b>hCdx2-AfelII</b>	910 -aagaa <b>agcgct</b> gcag-
hCdx2-AfIII-F/R	176 -S L <b>L</b> S Q -	hCdx2-Afel-F/R	247 -K K <b>A</b> L Q -

---

<b>hHoxb7-WT</b>	497 -agctcaggaactgac-	<b>hHoxb7-WT</b>	692 -aagaccgcgggcccg-
	132 -S S G T D -		197 -K T A G P -
<b>hHoxb7-AfIII</b>	497 -agctc <b>cttaag</b> tgac-	<b>hHoxb7-Afel</b>	692 -aagac <b>agcgct</b> cccg-
hHoxb7-AfIII-F/R	132 -S S <b>L S</b> D -	hHoxb7-Afel-F/R	197 -K T A <b>L</b> P -

B



**Figure 55. Mutants chimériques.**

Séquences des acides nucléiques et aminés dans lesquelles les sites de restriction sont insérés (rectangle). En rouge sont identifiés les acides nucléiques et les acides aminés changés. Les nombres correspondent à la position du premier acide nucléique/aminoé (A). Les mutants sont représentés schématiquement, en rouge les éléments de CDX2 et en bleu de HOXB7 (B).

Par exemple, pour construire le mutant F-B7<sup>Nt+HD</sup>C2<sup>Ct</sup>, pcDNA3-Flag-hHoxb7 est digéré par NdeI et AfeI, de même pour pFlag-CMV2-Cdx2. Deux fragments sont ainsi obtenus pour chaque plasmide, l'un contenant la séquence codant pour le TAD et HD, l'autre étant le reste du vecteur. Ces fragments sont alors séparés par leur taille sur gel d'agarose. Le fragment contenant le TAD et HD de HOXB7, et celui contenant le reste du vecteur de *Cdx2* sont purifiés sur gel puis reliés ensemble par la T4 DNA ligase (Biolabs).

#### D. Les mutants de phosphorylation

J'ai inséré dans le *Cdx2* humain, les mutations des sites de phosphorylation réalisées par I. Gross chez la souris (Gross et al., 2005). Il s'agit de la mutation des quatre sérines situées dans la partie C-terminale de la protéine et intervenant dans sa stabilité. Ces sérines sont conservées entre la souris et l'humain, j'ai donc pu les modifier par mutagenèse dirigée (kit QuickChange II XL Site, Agilent). Il s'agit du changement de quatre sérines en quatre alanines (4SA), empêchant ainsi la fixation d'un groupement phosphate, ou en acide glutamique (4SE) dont l'encombrement stérique simule un état de phosphorylation constitutionnelle (Fig. 56).

#### E. Les mutants de l'héxapeptide

HOXB7 possède une région spécifique en amont de son homéodomaine. Il s'agit d'un héxapeptide (IYPWMR) sur lequel se fixe PBX (Chang et al., 1995). Les deux acides aminés importants sont le tryptophane et la méthionine. Ils sont conservés au cours de l'évolution et sont donc présents chez CDX2. Afin de voir si cet héxapeptide et les protéines qui s'y fixent jouent un rôle dans la fonction de CDX2 et HOXB7 sur la réparation, j'ai muté les acides aminés de l'héxapeptide, site de liaison à PBX. La mutation de la méthionine et du tryptophane en alanine entraîne une perte de l'interaction avec PBX. J'ai donc introduit cette mutation par mutagenèse dirigée (kit QuickChange II XL Site, Agilent) (Fig. 57A). L'héxapeptide de CDX2 n'étant pas entièrement composé des mêmes acides aminés que HOXB7, ce qui pourrait moduler l'interaction avec les différents PBX, j'ai donc également muté les acides aminés de l'héxapeptide afin de transformer celui de CDX2 en HOXB7 et inversement (Fig. 57B).

<b>hCdx2-WT</b>	1021	-agtccggtgtcttccctgcaagcctcagtgctggctct-
	283	-S P V S S L Q A S V P G S -
<b>hCdx2-4SA</b>	1021	-gctccggtgtctgcctgcaagccgcagtgctggcgct-
hCdx2-4SA-F/R	283	-A P V S A L Q A A V P G A -
<b>hCdx2-4SE</b>	1021	-gaaaccggtgtctgaactgcaagccgaagtgctggcgaa-
hCdx2-4SE-F/R	283	-E P V S E L Q A E V P G E -

**Figure 56. Mutants de phosphorylation.**

Séquences des acides nucléiques et aminés dans lesquels les sérines (S) sont mutées en alanines (A) ou acide glutamique (E) (rouge).

**A**

<b>hCdx2-WT</b>	666	-ctgtgcgagtgatgagg-
	165	-L C E W M R -
<b>hCdx2-WM-AA</b>	666	-ctgtgcgagggcgagg-
hCdx2-WM-AA-F/R	165	-L C E A A R -

---

<b>hHoxb7-WT</b>	479	-atctaccctggatgcca-
	126	-I Y P W M R -
<b>hHoxb7-WM-AA</b>	479	-atctaccctggatgcca-
hHoxb7-WM-AA-F/R	126	-I Y P A A R -

**B**

<b>hCdx2-WT</b>	666	-ctgtgcgagtgatgagg-
	165	-L C E W M R -
<b>hCdx2-Hexa-H7</b>	666	-atataccctggatgagg-
hCdx2-Hexa-H7-F/R	165	-I Y P W M R -

---

<b>hHoxb7-WT</b>	479	-atctaccctggatgcca-
	126	-I Y P W M R -
<b>hHoxb7-Hexa-C2</b>	479	-ctctgccaatggatgcca-
hHoxb7-Hexa-C2-F/R	126	-L C E W M R -

**Figure 57. Mutants de l'héxapeptide.**

Séquences des acides nucléiques et aminés dans lesquels le tryptophane (W) et la méthionine (M) sont mutés en alanines (A) (rouge)(A). L'héxapeptide de CDX2 est transformé en celui de HOXB7 et inversement (B).

## 4. Analyses statistiques

Certains résultats obtenus pour la réparation ou l'activité transcription en luciférase sont analysés par un test statistique afin de définir si une différence entre deux conditions est significative ou non. Pour cela, j'ai réalisé des t-test sur un minimum de 3 valeurs (réalisé en triplicat ou duplicat selon la technique) en utilisant le logiciel GraphPad Prism 5.



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Abate-Shen, C.** (2002). Deregulated homeobox gene expression in cancer: cause or consequence? *Nat. Rev. Cancer* **2**, 777–785.
- Altobelli, E., Lattanzi, A., Paduano, R., Varassi, G. and di Orio, F.** (2014). Colorectal cancer prevention in Europe: Burden of disease and status of screening programs. *Prev. Med.* **62C**, 132–141.
- Aoki, K. and Taketo, M. M.** (2007). Adenomatous polyposis coli (APC): a multi-functional tumor suppressor gene. *J. Cell Sci.* **120**, 3327–3335.
- Aoki, K., Tamai, Y., Horiike, S., Oshima, M. and Taketo, M. M.** (2003). Colonic polyposis caused by mTOR-mediated chromosomal instability in *Apc*<sup>+</sup>/*Delta*716 *Cdx2*<sup>+/-</sup> compound mutant mice. *Nat. Genet.* **35**, 323–330.
- Aoki, K., Kakizaki, F., Sakashita, H., Manabe, T., Aoki, M. and Taketo, M. M.** (2011). Suppression of colonic polyposis by homeoprotein CDX2 through its nontranscriptional function that stabilizes p27Kip1. *Cancer Res.* **71**, 593–602.
- Argiropoulos, B. and Humphries, R. K.** (2007). Hox genes in hematopoiesis and leukemogenesis. *Oncogene* **26**, 6766–6776.
- Baba, Y., Noshu, K., Shima, K., Freed, E., Irahara, N., Philips, J., Meyerhardt, J. A., Hornick, J. L., Shivdasani, R. A., Fuchs, C. S., et al.** (2009). Relationship of CDX2 loss with molecular features and prognosis in colorectal cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **15**, 4665–4673.
- Bai, Y.-Q., Miyake, S., Iwai, T. and Yuasa, Y.** (2003). CDX2, a homeobox transcription factor, upregulates transcription of the p21/WAF1/CIP1 gene. *Oncogene* **22**, 7942–7949.
- Bakaris, S., Cetinkaya, A., Ezberci, F. and Ekerbicer, H.** (2008). Expression of homeodomain protein CDX2 in colorectal adenoma and adenocarcinoma. *Histol. Histopathol.* **23**, 1043–1047.
- Bansal, D., Scholl, C., Fröhling, S., McDowell, E., Lee, B. H., Döhner, K., Ernst, P., Davidson, A. J., Daley, G. Q., Zon, L. I., et al.** (2006). *Cdx4* dysregulates Hox gene expression and generates acute myeloid leukemia alone and in cooperation with *Meis1a* in a murine model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 16924–16929.
- Barros, R., Pereira, B., Duluc, I., Azevedo, M., Mendes, N., Camilo, V., Jacobs, R. J., Paulo, P., Santos-Silva, F., van Seuning, I., et al.** (2008). Key elements of the BMP/SMAD pathway co-localize with CDX2 in intestinal metaplasia and regulate CDX2 expression in human gastric cell lines. *J. Pathol.* **215**, 411–420.
- Barros, R., da Costa, L. T., Pinto-de-Sousa, J., Duluc, I., Freund, J.-N., David, L. and Almeida, R.** (2011). CDX2 autoregulation in human intestinal metaplasia of the stomach: impact on the stability of the phenotype. *Gut* **60**, 290–298.
- Barros, R., Freund, J.-N., David, L. and Almeida, R.** (2012). Gastric intestinal metaplasia revisited: function and regulation of CDX2. *Trends Mol. Med.*
- Bass, A. J., Watanabe, H., Mermel, C. H., Yu, S., Perner, S., Verhaak, R. G., Kim, S. Y., Wardwell, L., Tamayo, P., Gat-Viks, I., et al.** (2009). SOX2 is an amplified lineage-survival oncogene in lung and esophageal squamous cell carcinomas. *Nat. Genet.* **41**, 1238–1242.

- Baumgartner, W.** (2013). Possible roles of LI-Cadherin in the formation and maintenance of the intestinal epithelial barrier. *Tissue Barriers* **1**, e23815.
- Beck, F.** (2004). The role of Cdx genes in the mammalian gut. *Gut* **53**, 1394–1396.
- Beck, F., Chawengsaksophak, K., Waring, P., Playford, R. J. and Furness, J. B.** (1999). Reprogramming of intestinal differentiation and intercalary regeneration in Cdx2 mutant mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 7318–7323.
- Beck, C., Boehler, C., Guirouilh Barbat, J., Bonnet, M.-E., Illuzzi, G., Ronde, P., Gauthier, L. R., Magroun, N., Rajendran, A., Lopez, B. S., et al.** (2014). PARP3 affects the relative contribution of homologous recombination and nonhomologous end-joining pathways. *Nucleic Acids Res.* **42**, 5616–5632.
- Benahmed, F., Gross, I., Guenot, D., Jehan, F., Martin, E., Domon-Dell, C., Brabletz, T., Kedinger, M., Freund, J.-N. and Duluc, I.** (2007). The microenvironment controls CDX2 homeobox gene expression in colorectal cancer cells. *Am. J. Pathol.* **170**, 733–744.
- Benahmed, F., Gross, I., Gaunt, S. J., Beck, F., Jehan, F., Domon-Dell, C., Martin, E., Kedinger, M., Freund, J.-N. and Duluc, I.** (2008). Multiple regulatory regions control the complex expression pattern of the mouse Cdx2 homeobox gene. *Gastroenterology* **135**, 1238–1247, 1247.e1–3.
- Bhat, A. A., Sharma, A., Pope, J., Krishnan, M., Washington, M. K., Singh, A. B. and Dhawan, P.** (2012). Caudal homeobox protein Cdx-2 cooperates with Wnt pathway to regulate claudin-1 expression in colon cancer cells. *PLoS One* **7**, e37174.
- Blache, P., van de Wetering, M., Duluc, I., Domon, C., Berta, P., Freund, J.-N., Clevers, H. and Jay, P.** (2004). SOX9 is an intestine crypt transcription factor, is regulated by the Wnt pathway, and represses the CDX2 and MUC2 genes. *J. Cell Biol.* **166**, 37–47.
- Bonhomme, C., Duluc, I., Martin, E., Chawengsaksophak, K., Chenard, M.-P., Kedinger, M., Beck, F., Freund, J.-N. and Domon-Dell, C.** (2003). The Cdx2 homeobox gene has a tumour suppressor function in the distal colon in addition to a homeotic role during gut development. *Gut* **52**, 1465–1471.
- Bonhomme, C., Calon, A., Martin, E., Robine, S., Neuville, A., Kedinger, M., Domon-Dell, C., Duluc, I. and Freund, J.-N.** (2008). Cdx1, a dispensable homeobox gene for gut development with limited effect in intestinal cancer. *Oncogene* **27**, 4497–4502.
- Boulanger, J., Vézina, A., Mongrain, S., Boudreau, F., Perreault, N., Auclair, B. A., Lainé, J., Asselin, C. and Rivard, N.** (2005). Cdk2-dependent phosphorylation of homeobox transcription factor CDX2 regulates its nuclear translocation and proteasome-mediated degradation in human intestinal epithelial cells. *J. Biol. Chem.* **280**, 18095–18107.
- Boyd, M., Bressendorff, S., Møller, J., Olsen, J. and Troelsen, J. T.** (2009). Mapping of HNF4alpha target genes in intestinal epithelial cells. *BMC Gastroenterol.* **9**, 68.
- Brabletz, T., Spaderna, S., Kolb, J., Hlubek, F., Faller, G., Bruns, C. J., Jung, A., Nentwich, J., Duluc, I., Domon-Dell, C., et al.** (2004). Down-regulation of the homeodomain factor Cdx2 in colorectal cancer by collagen type I: an active role for the tumor environment in malignant tumor progression. *Cancer Res.* **64**, 6973–6977.

- Brabletz, T., Hlubek, F., Spaderna, S., Schmalhofer, O., Hiendlmeyer, E., Jung, A. and Kirchner, T.** (2005a). Invasion and metastasis in colorectal cancer: epithelial-mesenchymal transition, mesenchymal-epithelial transition, stem cells and beta-catenin. *Cells Tissues Organs* **179**, 56–65.
- Brabletz, T., Jung, A., Spaderna, S., Hlubek, F. and Kirchner, T.** (2005b). Opinion: migrating cancer stem cells - an integrated concept of malignant tumour progression. *Nat. Rev. Cancer* **5**, 744–749.
- Brooke, N. M., Garcia-Fernández, J. and Holland, P. W.** (1998). The ParaHox gene cluster is an evolutionary sister of the Hox gene cluster. *Nature* **392**, 920–922.
- Buchet-Poyau, K., Courchet, J., Le Hir, H., Séraphin, B., Scoazec, J.-Y., Duret, L., Domon-Dell, C., Freund, J.-N. and Billaud, M.** (2007). Identification and characterization of human Mex-3 proteins, a novel family of evolutionarily conserved RNA-binding proteins differentially localized to processing bodies. *Nucleic Acids Res.* **35**, 1289–1300.
- Bunting, S. F. and Nussenzweig, A.** (2013). End-joining, translocations and cancer. *Nat. Rev. Cancer* **13**, 443–454.
- Calon, A., Gross, I., Davidson, I., Kedinger, M., Duluc, I., Domon-Dell, C. and Freund, J.-N.** (2007a). Functional interaction between the homeoprotein CDX1 and the transcriptional machinery containing the TATA-binding protein. *Nucleic Acids Res.* **35**, 175–185.
- Calon, A., Gross, I., Lhermitte, B., Martin, E., Beck, F., Duclos, B., Kedinger, M., Duluc, I., Domon-Dell, C. and Freund, J.-N.** (2007b). Different effects of the Cdx1 and Cdx2 homeobox genes in a murine model of intestinal inflammation. *Gut* **56**, 1688–1695.
- Carè, A., Valtieri, M., Mattia, G., Meccia, E., Masella, B., Luchetti, L., Felicetti, F., Colombo, M. P. and Peschle, C.** (1999). Enforced expression of HOXB7 promotes hematopoietic stem cell proliferation and myeloid-restricted progenitor differentiation. *Oncogene* **18**, 1993–2001.
- Carè, A., Felicetti, F., Meccia, E., Bottero, L., Parenza, M., Stoppacciaro, A., Peschle, C. and Colombo, M. P.** (2001). HOXB7: a key factor for tumor-associated angiogenic switch. *Cancer Res.* **61**, 6532–6539.
- Casey, G., Yamanaka, Y., Friess, H., Kobrin, M. S., Lopez, M. E., Buchler, M., Beger, H. G. and Korc, M.** (1993). p53 mutations are common in pancreatic cancer and are absent in chronic pancreatitis. *Cancer Lett.* **69**, 151–160.
- Chai, W., Ford, L. P., Lenertz, L., Wright, W. E. and Shay, J. W.** (2002). Human Ku70/80 associates physically with telomerase through interaction with hTERT. *J. Biol. Chem.* **277**, 47242–47247.
- Chang, C. P., Shen, W. F., Rozenfeld, S., Lawrence, H. J., Largman, C. and Cleary, M. L.** (1995). Pbx proteins display hexapeptide-dependent cooperative DNA binding with a subset of Hox proteins. *Genes Dev.* **9**, 663–674.
- Chatelin, L., Volovitch, M., Joliot, A. H., Perez, F. and Prochiantz, A.** (1996). Transcription factor hoxa-5 is taken up by cells in culture and conveyed to their nuclei. *Mech. Dev.* **55**, 111–117.
- Chawengsaksophak, K., James, R., Hammond, V. E., Köntgen, F. and Beck, F.** (1997). Homeosis and intestinal tumours in Cdx2 mutant mice. *Nature* **386**, 84–87.

- Chawengsaksophak, K., de Graaff, W., Rossant, J., Deschamps, J. and Beck, F.** (2004). Cdx2 is essential for axial elongation in mouse development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 7641–7645.
- Chen, D. J. and Nirodi, C. S.** (2007). The epidermal growth factor receptor: a role in repair of radiation-induced DNA damage. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **13**, 6555–6560.
- Chen, H., Lee, J. S., Liang, X., Zhang, H., Zhu, T., Zhang, Z., Taylor, M. E., Zahnow, C., Feigenbaum, L., Rein, A., et al.** (2008). Hoxb7 inhibits transgenic HER-2/neu-induced mouse mammary tumor onset but promotes progression and lung metastasis. *Cancer Res.* **68**, 3637–3644.
- Coskun, M., Troelsen, J. T. and Nielsen, O. H.** (2011). The role of CDX2 in intestinal homeostasis and inflammation. *Biochim. Biophys. Acta* **1812**, 283–289.
- Coskun, M., Olsen, A. K., Bzorek, M., Holck, S., Engel, U. H., Nielsen, O. H. and Troelsen, J. T.** (2014). Involvement of CDX2 in the cross talk between TNF- $\alpha$  and Wnt signaling pathway in the colon cancer cell line Caco-2. *Carcinogenesis* **35**, 1185–1192.
- Crissey, M. A. S., Guo, R.-J., Funakoshi, S., Kong, J., Liu, J. and Lynch, J. P.** (2011). Cdx2 levels modulate intestinal epithelium maturity and Paneth cell development. *Gastroenterology* **140**, 517–528.e8.
- Cui, X., Yu, Y., Gupta, S., Cho, Y.-M., Lees-Miller, S. P. and Meek, K.** (2005). Autophosphorylation of DNA-dependent protein kinase regulates DNA end processing and may also alter double-strand break repair pathway choice. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 10842–10852.
- Da Costa, L. T., He, T. C., Yu, J., Sparks, A. B., Morin, P. J., Polyak, K., Laken, S., Vogelstein, B. and Kinzler, K. W.** (1999). CDX2 is mutated in a colorectal cancer with normal APC/beta-catenin signaling. *Oncogene* **18**, 5010–5014.
- Dang, D. T., Mahatan, C. S., Dang, L. H., Agboola, I. A. and Yang, V. W.** (2001). Expression of the gut-enriched Krüppel-like factor (Krüppel-like factor 4) gene in the human colon cancer cell line RKO is dependent on CDX2. *Oncogene* **20**, 4884–4890.
- Dantzig, A. H., Hoskins, J. A., Tabas, L. B., Bright, S., Shepard, R. L., Jenkins, I. L., Duckworth, D. C., Sportsman, J. R., Mackensen, D. and Rosteck, P. R.** (1994). Association of intestinal peptide transport with a protein related to the cadherin superfamily. *Science* **264**, 430–433.
- Davidson, A. J., Ernst, P., Wang, Y., Dekens, M. P. S., Kingsley, P. D., Palis, J., Korsmeyer, S. J., Daley, G. Q. and Zon, L. I.** (2003). cdx4 mutants fail to specify blood progenitors and can be rescued by multiple hox genes. *Nature* **425**, 300–306.
- Davidson, D., Wang, Y., Aloyz, R. and Panasci, L.** (2013). The PARP inhibitor ABT-888 synergizes irinotecan treatment of colon cancer cell lines. *Invest. New Drugs* **31**, 461–468.
- De Laat, W. L., Jaspers, N. G. and Hoeijmakers, J. H.** (1999). Molecular mechanism of nucleotide excision repair. *Genes Dev.* **13**, 768–785.
- De Sousa E Melo, F., Wang, X., Jansen, M., Fessler, E., Trinh, A., de Rooij, L. P. M. H., de Jong, J. H., de Boer, O. J., van Leersum, R., Bijlsma, M. F., et al.** (2013). Poor-prognosis colon cancer is defined by a molecularly distinct subtype and develops from serrated precursor lesions. *Nat. Med.* **19**, 614–618.

- De Souza Setubal Destro, M. F., Bitu, C. C., Zecchin, K. G., Graner, E., Lopes, M. A., Kowalski, L. P. and Coletta, R. D.** (2010). Overexpression of HOXB7 homeobox gene in oral cancer induces cellular proliferation and is associated with poor prognosis. *Int. J. Oncol.* **36**, 141–149.
- De Vos, M., Schreiber, V. and Dantzer, F.** (2012). The diverse roles and clinical relevance of PARPs in DNA damage repair: Current state of the art. *Biochem. Pharmacol.* **84**, 137–146.
- De Zio, D., Bordi, M., Tino, E., Lanzuolo, C., Ferraro, E., Mora, E., Ciccocanti, F., Fimia, G. M., Orlando, V. and Cecconi, F.** (2010). The DNA repair complex Ku70/86 modulates Apaf1 expression upon DNA damage. *Cell Death Differ.*
- Deriano, L. and Roth, D. B.** (2013). Modernizing the nonhomologous end-joining repertoire: alternative and classical NHEJ share the stage. *Annu. Rev. Genet.* **47**, 433–455.
- Derossi, D., Joliot, A. H., Chassaing, G. and Prochiantz, A.** (1994). The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. *J. Biol. Chem.* **269**, 10444–10450.
- Deschamps, J. and Wijgerde, M.** (1993). Two phases in the establishment of HOX expression domains. *Dev. Biol.* **156**, 473–480.
- Deschamps, J., de Laaf, R., Verrijzer, P., de Gouw, M., Destrée, O. and Meijlink, F.** (1987). The mouse Hox2.3 homeobox-containing gene: regulation in differentiating pluripotent stem cells and expression pattern in embryos. *Differ. Res. Biol. Divers.* **35**, 21–30.
- Di Pietro, M., Lao-Sirieix, P., Boyle, S., Cassidy, A., Castillo, D., Saadi, A., Eskeland, R. and Fitzgerald, R. C.** (2012). Evidence for a functional role of epigenetically regulated midcluster HOXB genes in the development of Barrett esophagus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 9077–9082.
- Domon-Dell, C., Wang, Q., Kim, S., Keding, M., Evers, B. M. and Freund, J.-N.** (2002). Stimulation of the intestinal Cdx2 homeobox gene by butyrate in colon cancer cells. *Gut* **50**, 525–529.
- Domon-Dell, C., Schneider, A., Moucadel, V., Guerin, E., Guenot, D., Aguilon, S., Duluc, I., Martin, E., Iovanna, J., Launay, J.-F., et al.** (2003). Cdx1 homeobox gene during human colon cancer progression. *Oncogene* **22**, 7913–7921.
- Douglas, P., Cui, X., Block, W. D., Yu, Y., Gupta, S., Ding, Q., Ye, R., Morrice, N., Lees-Miller, S. P. and Meek, K.** (2007). The DNA-dependent protein kinase catalytic subunit is phosphorylated in vivo on threonine 3950, a highly conserved amino acid in the protein kinase domain. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 1581–1591.
- Drummond, F. J., Sowden, J., Morrison, K. and Edwards, Y. H.** (1998). Colon carbonic anhydrase 1: transactivation of gene expression by the homeodomain protein Cdx2. *FEBS Lett.* **423**, 218–222.
- Durston, A. J., Jansen, H. J., In der Rieden, P. and Hooiveld, M. H. W.** (2011). Hox collinearity - a new perspective. *Int. J. Dev. Biol.* **55**, 899–908.
- Dynan, W. S. and Yoo, S.** (1998). Interaction of Ku protein and DNA-dependent protein kinase catalytic subunit with nucleic acids. *Nucleic Acids Res.* **26**, 1551–1559.
- Errico, M. C., Felicetti, F., Bottero, L., Mattia, G., Boe, A., Felli, N., Petrini, M., Bellenghi, M., Pandha, H. S., Calvaruso, M., et al.** (2013). The abrogation of the HOXB7/PBX2 complex

- induces apoptosis in melanoma through the miR-221&222-c-FOS pathway. *Int. J. Cancer* **133**, 879–892.
- Faber, K., Bullinger, L., Ragu, C., Garding, A., Mertens, D., Miller, C., Martin, D., Walcher, D., Döhner, K., Döhner, H., et al.** (2013). CDX2-driven leukemogenesis involves KLF4 repression and deregulated PPAR $\gamma$  signaling. *J. Clin. Invest.* **123**, 299–314.
- Fang, R., Santiago, N. A., Olds, L. C. and Sibley, E.** (2000). The homeodomain protein Cdx2 regulates lactase gene promoter activity during enterocyte differentiation. *Gastroenterology* **118**, 115–127.
- Fattah, F., Lee, E. H., Weisensel, N., Wang, Y., Lichter, N. and Hendrickson, E. A.** (2010). Ku regulates the non-homologous end joining pathway choice of DNA double-strand break repair in human somatic cells. *PLoS Genet.* **6**, e1000855.
- Fearon, E. R.** (2011). Molecular genetics of colorectal cancer. *Annu. Rev. Pathol.* **6**, 479–507.
- Fearon, E. R. and Vogelstein, B.** (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* **61**, 759–767.
- Featherstone, C. and Jackson, S. P.** (1999). Ku, a DNA repair protein with multiple cellular functions? *Mutat. Res. Repair* **434**, 3–15.
- Felton, K. E. A., Gilchrist, D. M. and Andrew, S. E.** (2007). Constitutive deficiency in DNA mismatch repair. *Clin. Genet.* **71**, 483–498.
- Forcet, C., Etienne-Manneville, S., Gaude, H., Fournier, L., Debilly, S., Salmi, M., Baas, A., Olschwang, S., Clevers, H. and Billaud, M.** (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**, 1283–1292.
- Frank, K. M., Sharpless, N. E., Gao, Y., Sekiguchi, J. M., Ferguson, D. O., Zhu, C., Manis, J. P., Horner, J., DePinho, R. A. and Alt, F. W.** (2000). DNA ligase IV deficiency in mice leads to defective neurogenesis and embryonic lethality via the p53 pathway. *Mol. Cell* **5**, 993–1002.
- Freund, J. N., Domon-Dell, C., Keding, M. and Duluc, I.** (1998). The Cdx-1 and Cdx-2 homeobox genes in the intestine. *Biochem. Cell Biol. Biochim. Biol. Cell.* **76**, 957–969.
- Fridman, J. S. and Lowe, S. W.** (2003). Control of apoptosis by p53. *Oncogene* **22**, 9030–9040.
- Fröhling, S., Scholl, C., Bansal, D. and Huntly, B. J. P.** (2007). HOX gene regulation in acute myeloid leukemia: CDX marks the spot? *Cell Cycle Georget. Tex* **6**, 2241–2245.
- Gao, N. and Kaestner, K. H.** (2010). Cdx2 regulates endo-lysosomal function and epithelial cell polarity. *Genes Dev.* **24**, 1295–1305.
- Gao, Y., Ferguson, D. O., Xie, W., Manis, J. P., Sekiguchi, J., Frank, K. M., Chaudhuri, J., Horner, J., DePinho, R. A. and Alt, F. W.** (2000). Interplay of p53 and DNA-repair protein XRCC4 in tumorigenesis, genomic stability and development. *Nature* **404**, 897–900.
- Gao, N., White, P. and Kaestner, K. H.** (2009). Establishment of intestinal identity and epithelial-mesenchymal signaling by Cdx2. *Dev. Cell* **16**, 588–599.

- Garcia-Fernández, J. and Holland, P. W.** (1994). Archetypal organization of the amphioxus Hox gene cluster. *Nature* **370**, 563–566.
- Garraway, L. A. and Sellers, W. R.** (2006). Lineage dependency and lineage-survival oncogenes in human cancer. *Nat. Rev. Cancer* **6**, 593–602.
- Garraway, L. A., Widlund, H. R., Rubin, M. A., Getz, G., Berger, A. J., Ramaswamy, S., Beroukhi, R., Milner, D. A., Granter, S. R., Du, J., et al.** (2005). Integrative genomic analyses identify MITF as a lineage survival oncogene amplified in malignant melanoma. *Nature* **436**, 117–122.
- Gaymes, T. J., Mufti, G. J. and Rassool, F. V.** (2002). Myeloid leukemias have increased activity of the nonhomologous end-joining pathway and concomitant DNA misrepair that is dependent on the Ku70/86 heterodimer. *Cancer Res.* **62**, 2791–2797.
- Gehring, W. J.** (1987). Homeo boxes in the study of development. *Science* **236**, 1245–1252.
- Gehring, W. J., Affolter, M. and Bürglin, T.** (1994). Homeodomain proteins. *Annu. Rev. Biochem.* **63**, 487–526.
- Gerbe, F., van Es, J. H., Makrini, L., Brulin, B., Mellitzer, G., Robine, S., Romagnolo, B., Shroyer, N. F., Bourgaux, J.-F., Pignodel, C., et al.** (2011). Distinct ATOH1 and Neurog3 requirements define tuft cells as a new secretory cell type in the intestinal epithelium. *J. Cell Biol.* **192**, 767–780.
- Gomez-Cabello, D., Jimeno, S., Fernández-Ávila, M. J. and Huertas, P.** (2013). New tools to study DNA double-strand break repair pathway choice. *PLoS One* **8**, e77206.
- Goodman, F. R.** (2003). Congenital abnormalities of body patterning: embryology revisited. *The Lancet* **362**, 651–662.
- Grainger, S., Savory, J. G. A. and Lohnes, D.** (2010). Cdx2 regulates patterning of the intestinal epithelium. *Dev. Biol.* **339**, 155–165.
- Grier, D. G., Thompson, A., Kwasniewska, A., McGonigle, G. J., Halliday, H. L. and Lappin, T. R.** (2005). The pathophysiology of HOX genes and their role in cancer. *J. Pathol.* **205**, 154–171.
- Gross, I., Lhermitte, B., Domon-Dell, C., Duluc, I., Martin, E., Gaiddon, C., Kedinger, M. and Freund, J.-N.** (2005). Phosphorylation of the homeotic tumor suppressor Cdx2 mediates its ubiquitin-dependent proteasome degradation. *Oncogene* **24**, 7955–7963.
- Gross, I., Duluc, I., Benameur, T., Calon, A., Martin, E., Brabletz, T., Kedinger, M., Domon-Dell, C. and Freund, J.-N.** (2008). The intestine-specific homeobox gene Cdx2 decreases mobility and antagonizes dissemination of colon cancer cells. *Oncogene* **27**, 107–115.
- Gullo, C., Au, M., Feng, G. and Teoh, G.** (2006). The biology of Ku and its potential oncogenic role in cancer. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Cancer* **1765**, 223–234.
- Guo, R.-J., Suh, E. R. and Lynch, J. P.** (2004). The role of Cdx proteins in intestinal development and cancer. *Cancer Biol. Ther.* **3**, 593–601.
- Guo, R.-J., Funakoshi, S., Lee, H. H., Kong, J. and Lynch, J. P.** (2010). The intestine-specific transcription factor Cdx2 inhibits beta-catenin/TCF transcriptional activity by disrupting the beta-catenin-TCF protein complex. *Carcinogenesis* **31**, 159–166.



- Heyer, W.-D., Ehmsen, K. T. and Liu, J.** (2010). Regulation of homologous recombination in eukaryotes. *Annu. Rev. Genet.* **44**, 113–139.
- Hill, R. and Lee, P. W. K.** (2010). The DNA-dependent protein kinase (DNA-PK): More than just a case of making ends meet? *Cell Cycle Georget. Tex* **9**, 3460–3469.
- Hinkel, I., Duluc, I., Martin, E., Guenot, D., Freund, J.-N. and Gross, I.** (2012). Cdx2 controls expression of the protocadherin Mucdhl, an inhibitor of growth and  $\beta$ -catenin activity in colon cancer cells. *Gastroenterology* **142**, 875–885.e3.
- Hinoi, T., Lucas, P. C., Kuick, R., Hanash, S., Cho, K. R. and Fearon, E. R.** (2002). CDX2 regulates liver intestine-cadherin expression in normal and malignant colon epithelium and intestinal metaplasia. *Gastroenterology* **123**, 1565–1577.
- Holland, P. W.** (1999). Gene duplication: past, present and future. *Semin. Cell Dev. Biol.* **10**, 541–547.
- Holland, P. W.** (2001). Beyond the Hox: how widespread is homeobox gene clustering? *J. Anat.* **199**, 13–23.
- Holland, P. W. and Garcia-Fernàndez, J.** (1996). Hox genes and chordate evolution. *Dev. Biol.* **173**, 382–395.
- Holland, P. W. H., Booth, H. A. F. and Bruford, E. A.** (2007). Classification and nomenclature of all human homeobox genes. *BMC Biol.* **5**, 47.
- Hollande, F., Pannequin, J. and Joubert, D.** (2010). The long road to colorectal cancer therapy: searching for the right signals. *Drug Resist. Updat. Rev. Comment. Antimicrob. Anticancer Chemother.* **13**, 44–56.
- Homminga, I., Pieters, R. and Meijerink, J. P. P.** (2012). NKL homeobox genes in leukemia. *Leukemia* **26**, 572–581.
- Houde, M., Laprise, P., Jean, D., Blais, M., Asselin, C. and Rivard, N.** (2001). Intestinal epithelial cell differentiation involves activation of p38 mitogen-activated protein kinase that regulates the homeobox transcription factor CDX2. *J. Biol. Chem.* **276**, 21885–21894.
- Hryniuk, A., Grainger, S., Savory, J. G. A. and Lohnes, D.** (2012). Cdx function is required for maintenance of intestinal identity in the adult. *Dev. Biol.* **363**, 426–437.
- Hsieh, P. and Yamane, K.** (2008). DNA mismatch repair: molecular mechanism, cancer, and ageing. *Mech. Ageing Dev.* **129**, 391–407.
- Hsu, I. C., Metcalf, R. A., Sun, T., Welsh, J. A., Wang, N. J. and Harris, C. C.** (1991). Mutational hotspot in the p53 gene in human hepatocellular carcinomas. *Nature* **350**, 427–428.
- Hsu, H. L., Gilley, D., Galande, S. A., Hande, M. P., Allen, B., Kim, S. H., Li, G. C., Campisi, J., Kohwi-Shigematsu, T. and Chen, D. J.** (2000). Ku acts in a unique way at the mammalian telomere to prevent end joining. *Genes Dev.* **14**, 2807–2812.
- Hussain, S. P. and Harris, C. C.** (1998). Molecular epidemiology of human cancer: contribution of mutation spectra studies of tumor suppressor genes. *Cancer Res.* **58**, 4023–4037.

- Iliakis, G. (2009). Backup pathways of NHEJ in cells of higher eukaryotes: cell cycle dependence. *Radiother. Oncol. J. Eur. Soc. Ther. Radiol. Oncol.* **92**, 310–315.
- Izzard, R. A., Jackson, S. P. and Smith, G. C. (1999). Competitive and noncompetitive inhibition of the DNA-dependent protein kinase. *Cancer Res.* **59**, 2581–2586.
- James, R., Erler, T. and Kazenwadel, J. (1994). Structure of the murine homeobox gene *cdx-2*. Expression in embryonic and adult intestinal epithelium. *J. Biol. Chem.* **269**, 15229–15237.
- Jedrusik, A., Parfitt, D.-E., Guo, G., Skamagki, M., Grabarek, J. B., Johnson, M. H., Robson, P. and Zernicka-Goetz, M. (2008). Role of *Cdx2* and cell polarity in cell allocation and specification of trophectoderm and inner cell mass in the mouse embryo. *Genes Dev.* **22**, 2692–2706.
- Jeong, J., Juhn, K., Lee, H., Kim, S.-H., Min, B.-H., Lee, K.-M., Cho, M.-H., Park, G.-H. and Lee, K.-H. (2007). SIRT1 promotes DNA repair activity and deacetylation of Ku70. *Exp. Mol. Med.* **39**, 8–13.
- Jin, K., Kong, X., Shah, T., Penet, M.-F., Wildes, F., Sgroi, D. C., Ma, X.-J., Huang, Y., Kallioniemi, A., Landberg, G., et al. (2012). The HOXB7 protein renders breast cancer cells resistant to tamoxifen through activation of the EGFR pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, 2736–2741.
- Jonckheere, N., Vincent, A., Perrais, M., Ducourouble, M.-P., Male, A. K., Aubert, J.-P., Pigny, P., Carraway, K. L., Freund, J.-N., Renes, I. B., et al. (2007). The human mucin MUC4 is transcriptionally regulated by caudal-related homeobox, hepatocyte nuclear factors, forkhead box A, and GATA endodermal transcription factors in epithelial cancer cells. *J. Biol. Chem.* **282**, 22638–22650.
- Kazumori, H., Ishihara, S., Rumi, M. A. K., Kadowaki, Y. and Kinoshita, Y. (2006). Bile acids directly augment caudal related homeobox gene *Cdx2* expression in oesophageal keratinocytes in Barrett's epithelium. *Gut* **55**, 16–25.
- Keller, M. S., Ezaki, T., Guo, R.-J. and Lynch, J. P. (2004). *Cdx1* or *Cdx2* expression activates E-cadherin-mediated cell-cell adhesion and compaction in human COLO 205 cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **287**, G104–114.
- Kim, S., Domon-Dell, C., Wang, Q., Chung, D. H., Di Cristofano, A., Pandolfi, P. P., Freund, J.-N. and Evers, B. M. (2002). PTEN and TNF- $\alpha$  regulation of the intestinal-specific *Cdx-2* homeobox gene through a PI3K, PKB/Akt, and NF- $\kappa$ B-dependent pathway. *Gastroenterology* **123**, 1163–1178.
- Kim, S.-P., Park, J.-W., Lee, S.-H., Lim, J. H., Jang, B.-C., Lee, S.-H., Jang, I.-H., Freund, J.-N., Suh, S.-I., Mun, K. C., et al. (2004). Homeodomain protein CDX2 regulates COX-2 expression in colorectal cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **315**, 93–99.
- Kim, J. H., Rhee, Y.-Y., Bae, J. M., Cho, N.-Y. and Kang, G. H. (2013). Loss of CDX2/CK20 expression is associated with poorly differentiated carcinoma, the CpG island methylator phenotype, and adverse prognosis in microsatellite-unstable colorectal cancer. *Am. J. Surg. Pathol.* **37**, 1532–1541.
- Knoepfler, P. S. and Kamps, M. P. (1995). The pentapeptide motif of Hox proteins is required for cooperative DNA binding with Pbx1, physically contacts Pbx1, and enhances DNA binding by Pbx1. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 5811–5819.

- Kong, J., Crissey, M. A., Funakoshi, S., Kreindler, J. L. and Lynch, J. P.** (2011a). Ectopic Cdx2 expression in murine esophagus models an intermediate stage in the emergence of Barrett's esophagus. *PLoS One* **6**, e18280.
- Kong, X., Shen, Y., Jiang, N., Fei, X. and Mi, J.** (2011b). Emerging roles of DNA-PK besides DNA repair. *Cell. Signal.* **23**, 1273–1280.
- Kraus, W. L.** (2008). Transcriptional control by PARP-1: chromatin modulation, enhancer-binding, coregulation, and insulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* **20**, 294–302.
- Kress, C., Vogels, R., De Graaff, W., Bonnerot, C., Meijlink, F., Nicolas, J. F. and Deschamps, J.** (1990). Hox-2.3 upstream sequences mediate lacZ expression in intermediate mesoderm derivatives of transgenic mice. *Dev. Camb. Engl.* **109**, 775–786.
- Krishnakumar, R. and Kraus, W. L.** (2010). The PARP side of the nucleus: molecular actions, physiological outcomes, and clinical targets. *Mol. Cell* **39**, 8–24.
- Krueger, F., Madeja, Z., Hemberger, M., McMahon, M., Cook, S. J. and Gaunt, S. J.** (2009). Down-regulation of Cdx2 in colorectal carcinoma cells by the Raf-MEK-ERK 1/2 pathway. *Cell. Signal.* **21**, 1846–1856.
- Kummar, S., Chen, A., Parchment, R. E., Kinders, R. J., Ji, J., Tomaszewski, J. E. and Doroshow, J. H.** (2012). Advances in using PARP inhibitors to treat cancer. *BMC Med.* **10**, 25.
- Kunkel, T. A. and Erie, D. A.** (2005). DNA mismatch repair. *Annu. Rev. Biochem.* **74**, 681–710.
- Ladam, F. and Sagerström, C. G.** (2014). Hox regulation of transcription: more complex(es). *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* **243**, 4–15.
- Laßmann, S. and Werner, M.** (2014). Are caudal-type homeobox genes causal for gastro-esophageal reflux disease and Barrett's esophagus? *Dig. Dis. Sci.* **59**, 16–18.
- Lengerke, C. and Daley, G. Q.** (2012). Caudal genes in blood development and leukemia. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1266**, 47–54.
- Li, G. C., Ouyang, H., Li, X., Nagasawa, H., Little, J. B., Chen, D. J., Ling, C. C., Fuks, Z. and Cordon-Cardo, C.** (1998). Ku70: A Candidate Tumor Suppressor Gene for Murine T Cell Lymphoma. *Mol. Cell* **2**, 1–8.
- Li, Z., Owonikoko, T. K., Sun, S.-Y., Ramalingam, S. S., Doetsch, P. W., Xiao, Z.-Q., Khuri, F. R., Curran, W. J. and Deng, X.** (2012). c-Myc suppression of DNA double-strand break repair. *Neoplasia N. Y. N* **14**, 1190–1202.
- Liao, W.-T., Jiang, D., Yuan, J., Cui, Y.-M., Shi, X.-W., Chen, C.-M., Bian, X.-W., Deng, Y.-J. and Ding, Y.-Q.** (2011). HOXB7 as a prognostic factor and mediator of colorectal cancer progression. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **17**, 3569–3578.
- Lieber, M. R., Ma, Y., Pannicke, U. and Schwarz, K.** (2004). The mechanism of vertebrate nonhomologous DNA end joining and its role in V(D)J recombination. *DNA Repair* **3**, 817–826.
- Liu, T., Branch, D. R. and Jin, T.** (2006). Pbx1 is a co-factor for Cdx-2 in regulating proglucagon gene expression in pancreatic A cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* **249**, 140–149.

- Lorentz, O., Duluc, I., Arcangelis, A. D., Simon-Assmann, P., Kedinger, M. and Freund, J. N. (1997). Key role of the Cdx2 homeobox gene in extracellular matrix-mediated intestinal cell differentiation. *J. Cell Biol.* **139**, 1553–1565.
- Lorentz, O., Cadoret, A., Duluc, I., Capeau, J., Gespach, C., Cherqui, G. and Freund, J. N. (1999). Downregulation of the colon tumour-suppressor homeobox gene Cdx-2 by oncogenic ras. *Oncogene* **18**, 87–92.
- Luo, X. and Kraus, W. L. (2012). On PAR with PARP: cellular stress signaling through poly(ADP-ribose) and PARP-1. *Genes Dev.* **26**, 417–432.
- Lynch, H. T. and de la Chapelle, A. (2003). Hereditary Colorectal Cancer. *N. Engl. J. Med.* **348**, 919–932.
- Mallo, G. V., Soubeyran, P., Lissitzky, J. C., André, F., Farnarier, C., Marvaldi, J., Dagorn, J. C. and Iovanna, J. L. (1998). Expression of the Cdx1 and Cdx2 homeotic genes leads to reduced malignancy in colon cancer-derived cells. *J. Biol. Chem.* **273**, 14030–14036.
- Mallo, M., Wellik, D. M. and Deschamps, J. (2010). Hox genes and regional patterning of the vertebrate body plan. *Dev. Biol.* **344**, 7–15.
- Mann, R. S. and Affolter, M. (1998). Hox proteins meet more partners. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **8**, 423–429.
- Margalit, Y., Yarus, S., Shapira, E., Gruenbaum, Y. and Fainsod, A. (1993). Isolation and characterization of target sequences of the chicken CdxA homeobox gene. *Nucleic Acids Res.* **21**, 4915–4922.
- Mari, L., Milano, F., Parikh, K., Straub, D., Everts, V., Hoeben, K. K., Fockens, P., Buttar, N. S. and Krishnadath, K. K. (2014). A pSMAD/CDX2 complex is essential for the intestinalization of epithelial metaplasia. *Cell Rep.* **7**, 1197–1210.
- Marisa, L., de Reyniès, A., Duval, A., Selves, J., Gaub, M. P., Vescovo, L., Etienne-Grimaldi, M.-C., Schiappa, R., Guenot, D., Ayadi, M., et al. (2013). Gene expression classification of colon cancer into molecular subtypes: characterization, validation, and prognostic value. *PLoS Med.* **10**, e1001453.
- Markowitz, S. D., Dawson, D. M., Willis, J. and Willson, J. K. V. (2002). Focus on colon cancer. *Cancer Cell* **1**, 233–236.
- Matsuzaki, J., Suzuki, H., Tsugawa, H., Watanabe, M., Hossain, S., Arai, E., Saito, Y., Sekine, S., Akaike, T., Kanai, Y., et al. (2013). Bile Acids Increase Levels of MicroRNAs 221 and 222, Leading to Degradation of CDX2 During Esophageal Carcinogenesis. *Gastroenterology* **145**, 1300–1311.
- McGinnis, W., Levine, M. S., Hafen, E., Kuroiwa, A. and Gehring, W. J. (1984). A conserved DNA sequence in homeotic genes of the *Drosophila* Antennapedia and bithorax complexes. *Nature* **308**, 428–433.
- McKinney-Freeman, S. L., Lengerke, C., Jang, I.-H., Schmitt, S., Wang, Y., Philitas, M., Shea, J. and Daley, G. Q. (2008). Modulation of murine embryonic stem cell-derived CD41+c-kit+ hematopoietic progenitors by ectopic expression of Cdx genes. *Blood* **111**, 4944–4953.

- McVey, M. and Lee, S. E.** (2008). MMEJ repair of double-strand breaks (director's cut): deleted sequences and alternative endings. *Trends Genet. TIG* **24**, 529–538.
- Meek, K., Dang, V. and Lees-Miller, S. P.** (2008). DNA-PK: the means to justify the ends? *Adv. Immunol.* **99**, 33–58.
- Mimori, T., Akizuki, M., Yamagata, H., Inada, S., Yoshida, S. and Homma, M.** (1981). Characterization of a high molecular weight acidic nuclear protein recognized by autoantibodies in sera from patients with polymyositis-scleroderma overlap. *J. Clin. Invest.* **68**, 611–620.
- Miotto, B. and Graba, Y.** (2010). Control of DNA replication: a new facet of Hox proteins? *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* **32**, 800–807.
- Mladenov, E. and Iliakis, G.** (2011). Induction and repair of DNA double strand breaks: the increasing spectrum of non-homologous end joining pathways. *Mutat. Res.* **711**, 61–72.
- Molatore, S. and Ranzani, G. N.** (2004). Genetics of colorectal polyps. *Tech. Coloproctology* **8 Suppl 2**, s240–242.
- Morgan, R.** (2006). Hox genes: a continuation of embryonic patterning? *Trends Genet. TIG* **22**, 67–69.
- Moustacchi, E.** (2000). DNA damage and repair: consequences on dose-responses. *Mutat. Res.* **464**, 35–40.
- Mutoh, H., Hakamata, Y., Sato, K., Eda, A., Yanaka, I., Honda, S., Osawa, H., Kaneko, Y. and Sugano, K.** (2002). Conversion of gastric mucosa to intestinal metaplasia in Cdx2-expressing transgenic mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **294**, 470–479.
- Mutoh, H., Satoh, K., Kita, H., Sakamoto, H., Hayakawa, H., Yamamoto, H., Isoda, N., Tamada, K., Ido, K. and Sugano, K.** (2005). Cdx2 specifies the differentiation of morphological as well as functional absorptive enterocytes of the small intestine. *Int. J. Dev. Biol.* **49**, 867–871.
- Mutoh, H., Sakamoto, H., Hayakawa, H., Arao, Y., Satoh, K., Nokubi, M. and Sugano, K.** (2006). The intestine-specific homeobox gene Cdx2 induces expression of the basic helix-loop-helix transcription factor Math1. *Differ. Res. Biol. Divers.* **74**, 313–321.
- Mutoh, H., Hayakawa, H., Sakamoto, H. and Sugano, K.** (2007). Homeobox protein CDX2 reduces Cox-2 transcription by inactivating the DNA-binding capacity of nuclear factor-kappaB. *J. Gastroenterol.* **42**, 719–729.
- Natarajan, A. T. and Palitti, F.** (2008). DNA repair and chromosomal alterations. *Mutat. Res.* **657**, 3–7.
- Natoli, M., Christensen, J., El-Gebali, S., Felsani, A. and Anderle, P.** (2013). The role of CDX2 in Caco-2 cell differentiation. *Eur. J. Pharm. Biopharm. Off. J. Arbeitsgemeinschaft Für Pharm. Verfahrenstechnik EV* **85**, 20–25.
- Niessing, D., Blanke, S. and Jäckle, H.** (2002). Bicoid associates with the 5'-cap-bound complex of caudal mRNA and represses translation. *Genes Dev.* **16**, 2576–2582.

- Olsen, A. K., Coskun, M., Bzorek, M., Kristensen, M. H., Danielsen, E. T., Jørgensen, S., Olsen, J., Engel, U., Holck, S. and Troelsen, J. T. (2013). Regulation of APC and AXIN2 expression by intestinal tumor suppressor CDX2 in colon cancer cells. *Carcinogenesis* **34**, 1361–1369.
- Ouyang, K. J., Woo, L. L. and Ellis, N. A. (2008). Homologous recombination and maintenance of genome integrity: cancer and aging through the prism of human RecQ helicases. *Mech. Ageing Dev.* **129**, 425–440.
- Pacheco, I. I. and Macleod, R. J. (2008). CaSR stimulates secretion of Wnt5a from colonic myofibroblasts to stimulate CDX2 and sucrase-isomaltase using Ror2 on intestinal epithelia. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **295**, G748–759.
- Park, J., Schulz, S. and Waldman, S. A. (2000). Intestine-specific activity of the human guanylyl cyclase C promoter is regulated by Cdx2. *Gastroenterology* **119**, 89–96.
- Park, D. Y., Srivastava, A., Kim, G. H., Mino-Kenudson, M., Deshpande, V., Zukerberg, L. R., Song, G. A. and Lauwers, G. Y. (2010). CDX2 expression in the intestinal-type gastric epithelial neoplasia: frequency and significance. *Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc* **23**, 54–61.
- Pascucci, B., D’Errico, M., Parlanti, E., Giovannini, S. and Dogliotti, E. (2011). Role of nucleotide excision repair proteins in oxidative DNA damage repair: an updating. *Biochem. Biokhimiā* **76**, 4–15.
- Pastwa, E., Neumann, R. D. and Winters, T. A. (2001). In vitro repair of complex unligatable oxidatively induced DNA double-strand breaks by human cell extracts. *Nucleic Acids Res.* **29**, E78.
- Peltomäki, P. (2001). Deficient DNA mismatch repair: a common etiologic factor for colon cancer. *Hum. Mol. Genet.* **10**, 735–740.
- Peralta-Leal, A., Rodríguez-Vargas, J. M., Aguilar-Quesada, R., Rodríguez, M. I., Linares, J. L., de Almodóvar, M. R. and Oliver, F. J. (2009). PARP inhibitors: new partners in the therapy of cancer and inflammatory diseases. *Free Radic. Biol. Med.* **47**, 13–26.
- Pereira, B., Sousa, S., Barros, R., Carreto, L., Oliveira, P., Oliveira, C., Chartier, N. T., Plateroti, M., Rouault, J.-P., Freund, J.-N., et al. (2013). CDX2 regulation by the RNA-binding protein MEX3A: impact on intestinal differentiation and stemness. *Nucleic Acids Res.* **41**, 3986–3999.
- Perrault, R., Wang, H., Wang, M., Rosidi, B. and Iliakis, G. (2004). Backup pathways of NHEJ are suppressed by DNA-PK. *J. Cell. Biochem.* **92**, 781–794.
- Pilozzi, E., Onelli, M. R., Ziparo, V., Mercantini, P. and Ruco, L. (2004). CDX1 expression is reduced in colorectal carcinoma and is associated with promoter hypermethylation. *J. Pathol.* **204**, 289–295.
- Pleschke, J. M., Kleczkowska, H. E., Strohm, M. and Althaus, F. R. (2000). Poly(ADP-ribose) binds to specific domains in DNA damage checkpoint proteins. *J. Biol. Chem.* **275**, 40974–40980.
- Ralston, A. and Rossant, J. (2008). Cdx2 acts downstream of cell polarization to cell-autonomously promote trophectoderm fate in the early mouse embryo. *Dev. Biol.* **313**, 614–629.

- Raman, V., Martensen, S. A., Reisman, D., Evron, E., Odenwald, W. F., Jaffee, E., Marks, J. and Sukumar, S. (2000). Compromised HOXA5 function can limit p53 expression in human breast tumours. *Nature* **405**, 974–978.
- Rathaus, M., Lerrer, B. and Cohen, H. Y. (2009). Deubiquitylation: a novel DUB enzymatic activity for the DNA repair protein, Ku70. *Cell Cycle Georget. Tex* **8**, 1843–1852.
- Rawat, V. P. S., Cusan, M., Deshpande, A., Hiddemann, W., Quintanilla-Martinez, L., Humphries, R. K., Bohlander, S. K., Feuring-Buske, M. and Buske, C. (2004). Ectopic expression of the homeobox gene Cdx2 is the transforming event in a mouse model of t(12;13)(p13;q12) acute myeloid leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 817–822.
- Rawat, V. P. S., Thoene, S., Naidu, V. M., Arseni, N., Heilmeier, B., Metzeler, K., Petropoulos, K., Deshpande, A., Quintanilla-Martinez, L., Bohlander, S. K., et al. (2008). Overexpression of CDX2 perturbs HOX gene expression in murine progenitors depending on its N-terminal domain and is closely correlated with deregulated HOX gene expression in human acute myeloid leukemia. *Blood* **111**, 309–319.
- Rawat, V. P. S., Humphries, R. K. and Buske, C. (2012). Beyond HOX: the role of ParaHox genes in normal and malignant hematopoiesis. *Blood*.
- Ren, F., Sheng, W.-Q. and Du, X. (2013). CD133: a cancer stem cells marker, is used in colorectal cancers. *World J. Gastroenterol. WJG* **19**, 2603–2611.
- Renouf, B., Soret, C., Saandi, T., Delalande, F., Martin, E., Vanier, M., Duluc, I., Gross, I., Freund, J.-N. and Domon-Dell, C. (2012). Cdx2 homeoprotein inhibits non-homologous end joining in colon cancer but not in leukemia cells. *Nucleic Acids Res.* **40**, 3456–3469.
- Rezsohazy, R. (2014). Non-transcriptional interactions of Hox proteins: inventory, facts, and future directions. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* **243**, 117–131.
- Rings, E. H., Boudreau, F., Taylor, J. K., Moffett, J., Suh, E. R. and Traber, P. G. (2001). Phosphorylation of the serine 60 residue within the Cdx2 activation domain mediates its transactivation capacity. *Gastroenterology* **121**, 1437–1450.
- Rouhi, A. and Fröhling, S. (2013). Deregulation of the CDX2-KLF4 axis in acute myeloid leukemia and colon cancer. *Oncotarget* **4**, 174–175.
- Rubin, E., Wu, X., Zhu, T., Cheung, J. C. Y., Chen, H., Lorincz, A., Pandita, R. K., Sharma, G. G., Ha, H. C., Gasson, J., et al. (2007). A role for the HOXB7 homeodomain protein in DNA repair. *Cancer Res.* **67**, 1527–1535.
- Rustgi, A. K. (2007). The genetics of hereditary colon cancer. *Genes Dev.* **21**, 2525–2538.
- Saandi, T., Baraille, F., Derbal-Wolfrom, L., Cattin, A.-L., Benahmed, F., Martin, E., Cardot, P., Duclos, B., Ribeiro, A., Freund, J.-N., et al. (2013). Regulation of the tumor suppressor homeogene Cdx2 by HNF4 $\alpha$  in intestinal cancer. *Oncogene* **32**, 3782–3788.
- Sakaguchi, T., Gu, X., Golden, H. M., Suh, E., Rhoads, D. B. and Reinecker, H.-C. (2002). Cloning of the human claudin-2 5'-flanking region revealed a TATA-less promoter with conserved binding sites in mouse and human for caudal-related homeodomain proteins and hepatocyte nuclear factor-1 $\alpha$ . *J. Biol. Chem.* **277**, 21361–21370.

- Sakamoto, H., Mutoh, H., Hayakawa, H., Sashikawa, M. and Sugano, K. (2011). Cell lineage dynamics in the process leading to intestinal metaplasia. *J. Gastroenterol.* **46**, 620–628.
- Salari, K., Spulak, M. E., Cuff, J., Forster, A. D., Giacomini, C. P., Huang, S., Ko, M. E., Lin, A. Y., van de Rijn, M. and Pollack, J. R. (2012). CDX2 is an amplified lineage-survival oncogene in colorectal cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*
- Samuel, S. and Naora, H. (2005). Homeobox gene expression in cancer: insights from developmental regulation and deregulation. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl. 1990* **41**, 2428–2437.
- Sancar, A., Lindsey-Boltz, L. A., Unsal-Kaçmaz, K. and Linn, S. (2004). Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu. Rev. Biochem.* **73**, 39–85.
- Scholl, C., Bansal, D., Döhner, K., Eiwien, K., Huntly, B. J. P., Lee, B. H., Rücker, F. G., Schlenk, R. F., Bullinger, L., Döhner, H., et al. (2007). The homeobox gene CDX2 is aberrantly expressed in most cases of acute myeloid leukemia and promotes leukemogenesis. *J. Clin. Invest.* **117**, 1037–1048.
- Schreiber, V., Dantzer, F., Ame, J.-C. and de Murcia, G. (2006). Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 517–528.
- Scott, M. P. and Weiner, A. J. (1984). Structural relationships among genes that control development: sequence homology between the Antennapedia, Ultrabithorax, and fushi tarazu loci of *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **81**, 4115–4119.
- Sehgal, R., Sheahan, K., O’Connell, P. R., Hanly, A. M., Martin, S. T. and Winter, D. C. (2014). Lynch syndrome: an updated review. *Genes* **5**, 497–507.
- Seno, H., Oshima, M., Taniguchi, M.-A., Usami, K., Ishikawa, T.-O., Chiba, T. and Taketo, M. M. (2002). CDX2 expression in the stomach with intestinal metaplasia and intestinal-type cancer: Prognostic implications. *Int. J. Oncol.* **21**, 769–774.
- Shah, N. and Sukumar, S. (2010). The Hox genes and their roles in oncogenesis. *Nat. Rev. Cancer* **10**, 361–371.
- Shimakura, J., Terada, T., Shimada, Y., Katsura, T. and Inui, K. (2006). The transcription factor Cdx2 regulates the intestine-specific expression of human peptide transporter 1 through functional interaction with Sp1. *Biochem. Pharmacol.* **71**, 1581–1588.
- Shiojima, I., Komuro, I., Mizuno, T., Aikawa, R., Akazawa, H., Oka, T., Yamazaki, T. and Yazaki, Y. (1996). Molecular cloning and characterization of human cardiac homeobox gene CSX1. *Circ. Res.* **79**, 920–929.
- Sideris, M. and Papagrigoriadis, S. (2014). Molecular Biomarkers and Classification Models in the Evaluation of the Prognosis of Colorectal Cancer. *Anticancer Res.* **34**, 2061–2068.
- Silberg, D. G., Swain, G. P., Suh, E. R. and Traber, P. G. (2000). Cdx1 and cdx2 expression during intestinal development. *Gastroenterology* **119**, 961–971.
- Silberg, D. G., Sullivan, J., Kang, E., Swain, G. P., Moffett, J., Sund, N. J., Sackett, S. D. and Kaestner, K. H. (2002). Cdx2 ectopic expression induces gastric intestinal metaplasia in transgenic mice. *Gastroenterology* **122**, 689–696.



- Smith, G. C. and Jackson, S. P.** (1999). The DNA-dependent protein kinase. *Genes Dev.* **13**, 916–934.
- Smith, M. L. and Seo, Y. R.** (2002). p53 regulation of DNA excision repair pathways. *Mutagenesis* **17**, 149–156.
- Sodhi, R. K., Singh, N. and Jaggi, A. S.** (2010). Poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) and its therapeutic implications. *Vascul. Pharmacol.* **53**, 77–87.
- Song, X., Chen, H.-X., Wang, X.-Y., Deng, X.-Y., Xi, Y.-X., He, Q., Peng, T.-L., Chen, J., Chen, W., Wong, B. C.-Y., et al.** (2013). H. pylori-encoded CagA disrupts tight junctions and induces invasiveness of AGS gastric carcinoma cells via Cdx2-dependent targeting of Claudin-2. *Cell. Immunol.* **286**, 22–30.
- Soubeyran, P., André, F., Lissitzky, J. C., Mallo, G. V., Moucadel, V., Roccabianca, M., Rechreche, H., Marvaldi, J., Dikic, I., Dagorn, J. C., et al.** (1999). Cdx1 promotes differentiation in a rat intestinal epithelial cell line. *Gastroenterology* **117**, 1326–1338.
- Soussi, T. and Bérout, C.** (2003). Significance of TP53 mutations in human cancer: a critical analysis of mutations at CpG dinucleotides. *Hum. Mutat.* **21**, 192–200.
- Speake, D., Biyani, D., Frizelle, F. A. and Watson, A. J. M.** (2007). Flat adenomas. *ANZ J. Surg.* **77**, 4–8.
- Srebrow, A., Friedmann, Y., Ravanpay, A., Daniel, C. W. and Bissell, M. J.** (1998). Expression of Hoxa-1 and Hoxb-7 is regulated by extracellular matrix-dependent signals in mammary epithelial cells. *J. Cell. Biochem.* **69**, 377–391.
- Stasinopoulos, I. A., Mironchik, Y., Raman, A., Wildes, F., Winnard, P., Jr and Raman, V.** (2005). HOXA5-twist interaction alters p53 homeostasis in breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* **280**, 2294–2299.
- Stringer, E. J., Pritchard, C. A. and Beck, F.** (2008). Cdx2 initiates histodifferentiation of the midgut endoderm. *FEBS Lett.* **582**, 2555–2560.
- Stringer, E. J., Duluc, I., Saandi, T., Davidson, I., Bialecka, M., Sato, T., Barker, N., Clevers, H., Pritchard, C. A., Winton, D. J., et al.** (2012). Cdx2 determines the fate of postnatal intestinal endoderm. *Dev. Camb. Engl.* **139**, 465–474.
- Strumpf, D., Mao, C.-A., Yamanaka, Y., Ralston, A., Chawengsaksophak, K., Beck, F. and Rossant, J.** (2005). Cdx2 is required for correct cell fate specification and differentiation of trophoderm in the mouse blastocyst. *Dev. Camb. Engl.* **132**, 2093–2102.
- Subramanian, V., Meyer, B. I. and Gruss, P.** (1995). Disruption of the murine homeobox gene Cdx1 affects axial skeletal identities by altering the mesodermal expression domains of Hox genes. *Cell* **83**, 641–653.
- Subtil, C., Guérin, E., Schneider, A., Chenard, M.-P., Martin, E., Domon-Dell, C., Duluc, I., Brabletz, T., Keding, M., Duclos, B., et al.** (2007). Frequent rearrangements and amplification of the CDX2 homeobox gene in human sporadic colorectal cancers with chromosomal instability. *Cancer Lett.* **247**, 197–203.
- Suh, E. and Traber, P. G.** (1996). An intestine-specific homeobox gene regulates proliferation and differentiation. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 619–625.

- Tagawa, T., Haraguchi, T., Hiramatsu, H., Kobayashi, K., Sakurai, K., Inada, K.-I. and Iba, H.** (2012). Multiple microRNAs induced by Cdx1 suppress Cdx2 in human colorectal tumour cells. *Biochem. J.* **447**, 449–455.
- Takakura, Y., Hinoi, T., Oue, N., Sasada, T., Kawaguchi, Y., Okajima, M., Akyol, A., Fearon, E. R., Yasui, W. and Ohdan, H.** (2010). CDX2 regulates multidrug resistance 1 gene expression in malignant intestinal epithelium. *Cancer Res.* **70**, 6767–6778.
- Tentori, L., Portarena, I. and Graziani, G.** (2002). Potential clinical applications of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitors. *Pharmacol. Res. Off. J. Ital. Pharmacol. Soc.* **45**, 73–85.
- Terzoudi, G. I., Singh, S. K., Pantelias, G. E. and Iliakis, G.** (2008). Premature chromosome condensation reveals DNA-PK independent pathways of chromosome break repair. *Int. J. Oncol.* **33**, 871–879.
- Thoene, S., Rawat, V. P. S., Heilmeier, B., Hoster, E., Metzeler, K. H., Herold, T., Hiddemann, W., Gökbüget, N., Hoelzer, D., Bohlander, S. K., et al.** (2009). The homeobox gene CDX2 is aberrantly expressed and associated with an inferior prognosis in patients with acute lymphoblastic leukemia. *Leuk. Off. J. Leuk. Soc. Am. Leuk. Res. Fund UK* **23**, 649–655.
- Topisirovic, I., Culjkovic, B., Cohen, N., Perez, J. M., Skrabanek, L. and Borden, K. L. B.** (2003). The proline-rich homeodomain protein, PRH, is a tissue-specific inhibitor of eIF4E-dependent cyclin D1 mRNA transport and growth. *EMBO J.* **22**, 689–703.
- Tuteja, N., Tuteja, R., Ochem, A., Taneja, P., Huang, N. W., Simoncsits, A., Susic, S., Rahman, K., Marusic, L. and Chen, J.** (1994). Human DNA helicase II: a novel DNA unwinding enzyme identified as the Ku autoantigen. *EMBO J.* **13**, 4991–5001.
- Valerie, K. and Povirk, L. F.** (2003). Regulation and mechanisms of mammalian double-strand break repair. *Oncogene* **22**, 5792–5812.
- Van Gent, D. C. and van der Burg, M.** (2007). Non-homologous end-joining, a sticky affair. *Oncogene* **26**, 7731–7740.
- Velma, V., Carrero, Z. I., Cosman, A. M. and Hebert, M. D.** (2010). Coilin interacts with Ku proteins and inhibits in vitro non-homologous DNA end joining. *FEBS Lett.* **584**, 4735–4739.
- Verzi, M. P., Hatzis, P., Sulahian, R., Philips, J., Schuijers, J., Shin, H., Freed, E., Lynch, J. P., Dang, D. T., Brown, M., et al.** (2010a). TCF4 and CDX2, major transcription factors for intestinal function, converge on the same cis-regulatory regions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 15157–15162.
- Verzi, M. P., Shin, H., He, H. H., Sulahian, R., Meyer, C. A., Montgomery, R. K., Fleet, J. C., Brown, M., Liu, X. S. and Shivdasani, R. A.** (2010b). Differentiation-specific histone modifications reveal dynamic chromatin interactions and partners for the intestinal transcription factor CDX2. *Dev. Cell* **19**, 713–726.
- Verzi, M. P., Shin, H., Ho, L.-L., Liu, X. S. and Shivdasani, R. A.** (2011). Essential and redundant functions of caudal family proteins in activating adult intestinal genes. *Mol. Cell. Biol.* **31**, 2026–2039.
- Vias, M., Ramos-Montoya, A. and Mills, I. G.** (2008). Terminal and progenitor lineage-survival oncogenes as cancer markers. *Trends Mol. Med.* **14**, 486–494.

- Walker, J. R., Corpina, R. A. and Goldberg, J.** (2001). Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair. *Nature* **412**, 607–614.
- Wang, H., Zeng, Z. C., Perrault, A. R., Cheng, X., Qin, W. and Iliakis, G.** (2001a). Genetic evidence for the involvement of DNA ligase IV in the DNA-PK-dependent pathway of non-homologous end joining in mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* **29**, 1653–1660.
- Wang, H., Zeng, Z. C., Bui, T. A., Sonoda, E., Takata, M., Takeda, S. and Iliakis, G.** (2001b). Efficient rejoining of radiation-induced DNA double-strand breaks in vertebrate cells deficient in genes of the RAD52 epistasis group. *Oncogene* **20**, 2212–2224.
- Wang, M., Wu, W., Wu, W., Rosidi, B., Zhang, L., Wang, H. and Iliakis, G.** (2006). PARP-1 and Ku compete for repair of DNA double strand breaks by distinct NHEJ pathways. *Nucleic Acids Res.* **34**, 6170–6182.
- Wayne, C. M., Sutton, K. and Wilkinson, M. F.** (2002). Expression of the pem homeobox gene in Sertoli cells increases the frequency of adjacent germ cells with deoxyribonucleic acid strand breaks. *Endocrinology* **143**, 4875–4885.
- Wei, E. K., Colditz, G. A., Giovannucci, E. L., Fuchs, C. S. and Rosner, B. A.** (2009). Cumulative risk of colon cancer up to age 70 years by risk factor status using data from the Nurses' Health Study. *Am. J. Epidemiol.* **170**, 863–872.
- Weisenberger, D. J., Siegmund, K. D., Campan, M., Young, J., Long, T. I., Faasse, M. A., Kang, G. H., Widschwendter, M., Weener, D., Buchanan, D., et al.** (2006). CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. *Nat. Genet.* **38**, 787–793.
- Williams, M. E., Lehoczky, J. A. and Innis, J. W.** (2006). A group 13 homeodomain is neither necessary nor sufficient for posterior prevalence in the mouse limb. *Dev. Biol.* **297**, 493–507.
- Wilson, D. M., 3rd, Kim, D., Berquist, B. R. and Sigurdson, A. J.** (2011). Variation in base excision repair capacity. *Mutat. Res.* **711**, 100–112.
- Winslow, M. M., Dayton, T. L., Verhaak, R. G. W., Kim-Kiselak, C., Snyder, E. L., Feldser, D. M., Hubbard, D. D., DuPage, M. J., Whittaker, C. A., Hoersch, S., et al.** (2011). Suppression of lung adenocarcinoma progression by Nkx2-1. *Nature* **473**, 101–104.
- Wizenmann, A., Brunet, I., Lam, J. S. Y., Sonnier, L., Beurdeley, M., Zarbalis, K., Weisenhorn-Vogt, D., Weinl, C., Dwivedy, A., Joliot, A., et al.** (2009). Extracellular Engrailed participates in the topographic guidance of retinal axons in vivo. *Neuron* **64**, 355–366.
- Wu, X. and Lieber, M. R.** (1996). Protein-protein and protein-DNA interaction regions within the DNA end-binding protein Ku70-Ku86. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 5186–5193.
- Wu, X., Chen, H., Parker, B., Rubin, E., Zhu, T., Lee, J. S., Argani, P. and Sukumar, S.** (2006). HOXB7, a homeodomain protein, is overexpressed in breast cancer and confers epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Res.* **66**, 9527–9534.
- Wu, X., Ellmann, S., Rubin, E., Gil, M., Jin, K., Han, L., Chen, H., Kwon, E. M., Guo, J., Ha, H. C., et al.** (2012). ADP Ribosylation by PARP-1 Suppresses HOXB7 Transcriptional Activity. *PLoS ONE* **7**, e40644.

- Xin, S., Huixin, C., Benchang, S., Aiping, B., Jinhui, W., Xiaoyan, L., Yu, W. B. C. and Minhu, C. (2007). Expression of Cdx2 and claudin-2 in the multistage tissue of gastric carcinogenesis. *Oncology* **73**, 357–365.
- Xu, F., Li, H. and Jin, T. (1999). Cell type-specific autoregulation of the Caudal-related homeobox gene Cdx-2/3. *J. Biol. Chem.* **274**, 34310–34316.
- Yamaguchi, T., Yanagisawa, K., Sugiyama, R., Hosono, Y., Shimada, Y., Arima, C., Kato, S., Tomida, S., Suzuki, M., Osada, H., et al. (2012). NKX2-1/TTF1/TTF-1-Induced ROR1 is required to sustain EGFR survival signaling in lung adenocarcinoma. *Cancer Cell* **21**, 348–361.
- Yamamichi, N., Inada, K., Furukawa, C., Sakurai, K., Tando, T., Ishizaka, A., Haraguchi, T., Mizutani, T., Fujishiro, M., Shimomura, R., et al. (2009). Cdx2 and the Brm-type SWI/SNF complex cooperatively regulate villin expression in gastrointestinal cells. *Exp. Cell Res.* **315**, 1779–1789.
- Yamamoto, H., Bai, Y. Q. and Yuasa, Y. (2003). Homeodomain protein CDX2 regulates goblet-specific MUC2 gene expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **300**, 813–818.
- Yamane, L., Scapulatempo-Neto, C., Reis, R. M. and Guimarães, D. P. (2014). Serrated pathway in colorectal carcinogenesis. *World J. Gastroenterol. WJG* **20**, 2634–2640.
- Yang, Y., Hwang, C. K., D'Souza, U. M., Lee, S. H., Junn, E. and Mouradian, M. M. (2000). Three-amino acid extension loop homeodomain proteins Meis2 and TGIF differentially regulate transcription. *J. Biol. Chem.* **275**, 20734–20741.
- Yap, C. S., Sinha, R. A., Ota, S., Katsuki, M. and Yen, P. M. (2013). Thyroid hormone negatively regulates CDX2 and SOAT2 mRNA expression via induction of miRNA-181d in hepatic cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **440**, 635–639.
- Yaron, Y., McAdara, J. K., Lynch, M., Hughes, E. and Gasson, J. C. (2001). Identification of novel functional regions important for the activity of HOXB7 in mammalian cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **166**, 5058–5067.
- Zhang, X., Zhu, T., Chen, Y., Mertani, H. C., Lee, K.-O. and Lobie, P. E. (2003). Human growth hormone-regulated HOXA1 is a human mammary epithelial oncogene. *J. Biol. Chem.* **278**, 7580–7590.
- Zhang, X., Tsukamoto, T., Mizoshita, T., Ban, H., Suzuki, H., Toyoda, T. and Tatematsu, M. (2009). Expression of osteopontin and CDX2: indications of phenotypes and prognosis in advanced gastric cancer. *Oncol. Rep.* **21**, 609–613.
- Zhang, J.-F., Zhang, J.-G., Kuai, X.-L., Zhang, H., Jiang, W., Ding, W.-F., Li, Z.-L., Zhu, H.-J. and Mao, Z.-B. (2013). Reactivation of the homeotic tumor suppressor gene CDX2 by 5-aza-2'-deoxycytidine-induced demethylation inhibits cell proliferation and induces caspase-independent apoptosis in gastric cancer cells. *Exp. Ther. Med.* **5**, 735–741.
- Zorn, A. M. and Wells, J. M. (2009). Vertebrate endoderm development and organ formation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **25**, 221–251.

# **PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS**

## Publications

### ❖ Article 1 :

**Renouf, B., Soret, C., Saandi, T., Delalande, F., Martin, E., Vanier, M., Duluc, I., Gross, I., Freund, J.-N. and Domon-Dell, C.** (2012). Cdx2 homeoprotein inhibits non-homologous end joining in colon cancer but not in leukemia cells. *Nucleic Acids Res.* 40, 3456–3469.

### ❖ Article 2 :

**Soret, C., Martin, E., Vanier, M., Duluc, I., Gross, I., Domon-Dell, C., and Freund, J.-N.** Opposite functions of the CDX2 and HOXB7 homeoproteins on double-strand break DNA repair in colon cancer cells. Manuscrit en cours de rédaction.

### ❖ Article 3 :

**Vanier, M., Balbinot, C., Soret, C., Martin, M., Saandi, T., Robine, S., Domon-Dell, C., Reimund, J.-M., Launay, J.-F., Deschamps, J., Beck, F., Gross I., Duluc, I., Freund J.-N.** A splice variant modulates the transcriptional and non-transcriptional function of homeoprotein CDX2. Manuscrit soumis à *Gut*.

## Communications

### ❖ Présentation orale :

**C. Soret, B. Renouf, T. Saandi, J.-N. Freund, C. Domon-Dell.** Implication du facteur de transcription Cdx2 dans les mécanismes de réparation de l'ADN des cellules intestinales. *Clud d'Etude des Cellules Epithéliales et Digestives (CECED), Nice, 2011.*

### ❖ Présentation d'un poster :

**C. Soret, B. Renouf, T. Saandi, F. Delalande, E. Martin, M. Vanier, I. Duluc, I. Gross, J.-N. Freund, C. Domon-Dell.** Cdx2 homeoprotein inhibits non-homologous end joining in colon cancer but not in leukemia cells. *Gordon Research Conferences, DNA Damage, Mutation and Cancer, Ventura USA, 2012.*

**C. Soret, B. Renouf, C. Domon-Dell, T. Saandi, J.-N. Freund.** Cdx2 homeoprotein inhibits non-homologous end joining in colon cancer but not in leukemia cells. *Forum du Cancéropôle Grand Est, Strasbourg, 2012.*

**C. Soret, B. Renouf, T. Saandi, J.-N. Freund et C. Domon-Dell.** Cdx2 homeoprotein inhibits non-homologous end joining in colon cancer but not in leukemia cells. *Journée de la Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg (FMTS), Strasbourg, 2013.*

**Christine SORET**

## **Mise en évidence d'une fonction non-transcriptionnelle du facteur de transcription homéotique Cdx2**

Le cancer colorectal (CCR) représente la 2<sup>ème</sup> cause de mortalité par cancer dans les pays industrialisés. De nouveaux traitements permettant de bloquer l'évolution de la maladie sont nécessaires. Il est donc important de mieux connaître les acteurs impliqués dans la cancérogenèse. Lors du développement du cancer, des gènes suppresseurs de tumeur sont inhibés et des oncogènes sont activés, perturbant ainsi l'équilibre des cellules et les transformant. Au cours de ma thèse, je me suis intéressée à deux gènes homéotiques qui possèdent des rôles opposés dans les CCR. Cdx2 exerce un rôle suppresseur de tumeur, alors que HoxB7 agit comme un oncogène. Mon travail de thèse a permis (i) de mettre en évidence une nouvelle fonction non-transcriptionnelle de Cdx2 : inhibiteur de la réparation des cassures de l'ADN spécifiquement dans le côlon, (ii) et de révéler que le niveau d'expression des gènes Cdx2 et Hoxb7 au sein de la tumeur peut avoir une importance pour le choix du traitement des CCR.

Colorectal cancer is the 2nd cause of mortality by cancer in industrialized countries. New treatments allowing to prevent the evolution of the disease are needed. It is important to better understand the actors implicated in carcinogenesis. During cancer development, tumor suppressor genes are inhibited and oncogenes are activated, thus disrupting the homeostasis of the tissue and transforming the cells. During my thesis, I have been interested in two genes having two opposite functions in CCR : Cdx2 is a tumor suppressor while Hoxb7 acts as an oncogene. My work allows to highlight (i) a new non-transcriptional function of Cdx2 : inhibitor of the reparation of DNA breaks specifically in the colon, (ii) and that the expression level of Cdx2 and Hoxb7 genes inside the tumor can have an importance in the choice of the CCR treatment.