



HAL
open science

Implication et mode d'action de la cadhérine atypique MUCDHL dans la tumorigenèse intestinale

Marine Beck

► **To cite this version:**

Marine Beck. Implication et mode d'action de la cadhérine atypique MUCDHL dans la tumorigenèse intestinale. Cancer. Université de Strasbourg, 2019. Français. NNT : 2019STRAJ033 . tel-03820385

HAL Id: tel-03820385

<https://theses.hal.science/tel-03820385>

Submitted on 19 Oct 2022

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

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

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ (ED 414)

INSERM UMR_S 1113 :

Interface de Recherche Fondamentale et Appliquée en Cancérologie

THÈSE présentée par :

Marine BECK

soutenue le : **16 Septembre 2019**

pour obtenir le grade de : Docteur de l'Université de Strasbourg

Discipline / Spécialité : Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

IMPLICATION ET MODE D'ACTION DE LA CADHÉRINE ATYPIQUE MUCDHL DANS LA TUMORIGENÈSE INTESTINALE

THÈSE dirigée par :

Mme Isabelle GROSS

CRCN-HDR, INSERM U1113 - Strasbourg

RAPPORTEURS EXTERNES :

M. Frédéric ANDRE

MCF-HDR, INSERM U1068 - Marseille

M. Philippe BLACHE

DR, INSERM U1194 - Montpellier

EXAMINATEUR INTERNE :

Mme Monique DONTENWILL

DR, CNRS U7021 - Strasbourg

Ce travail a été financé par le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche et
par la fondation ARC

Il est l'heure de clôturer un chapitre important de ma vie, riche en apprentissage, en découverte, et en partage. Je tiens à remercier toutes les personnes qui de près ou de loin m'ont accompagnées tout au long de cette thèse.

Je tiens tout d'abord à remercier Madame Monique Dontenwill, Monsieur Frédéric André et Monsieur Philippe Blache de m'avoir fait l'honneur d'accepter de participer à mon jury de thèse et d'avoir consacré du temps à la lecture de mon manuscrit.

Je remercie l'équipe de Jean-Noël avec qui j'ai pris plaisir à travailler pendant cette thèse.

Merci à Jean-Noël, directeur d'unité, de m'avoir permis de réaliser cette thèse au sein de l'unité Inserm UMR_S 1113. Malgré tes nombreuses responsabilités, tu as toujours su te montrer disponible et cela a été un véritable plaisir de travailler avec toi. Je te remercie pour toutes ces discussions scientifiques qui auront permis de faire avancer le projet et qui m'auront permis de voir le projet sous un autre angle. Je n'oublierai pas non plus toutes ces discussions non scientifiques et ces anecdotes qui n'en étaient pas moins enrichissantes.

Un merci tout particulier à Isabelle G., ma directrice de thèse, sans qui cette thèse n'aurait tout simplement pas eue lieu. Un énorme merci pour la confiance que tu as su m'accorder en acceptant ma candidature de Master 2, et en m'accompagnant pendant ces années de thèse. Ton enthousiasme m'a rapidement contaminé et je t'ai accompagné avec plaisir dans la compréhension des mécanismes mis en jeu par ce petit « être » atypique qu'est MUCDHL. Travailler avec toi a été une expérience extrêmement enrichissante à tout point de vue que soit scientifiquement ou humainement. J'ai appris de très nombreuses choses à tes côtés et je te remercie sincèrement pour ton encadrement, tes conseils, ta bonne humeur et surtout ta disponibilité sans faille !

Un énorme merci à Elisabeth, pour ton immense dévouement qui a beaucoup contribué à l'avancée de ce projet. Je te remercie également pour ta présence et pour ton soutien tout au long de cette thèse.

Un grand merci également à Léonor pour ta disponibilité et grâce à qui les problèmes informatiques ou administratifs trouvent toujours une solution.

Je tiens également à remercier les autres membres de l'équipe : Claire, Dominique, Isabelle D., Jean-Marie, Laurent V., Manuela et Nathalie pour vos conseils et votre disponibilité.

Je remercie également tous les membres de l'équipe de Christian.

Merci à Christian, Georg, et Alain pour votre vision extérieure de mon projet et vos conseils.

Merci à Christophe pour toutes ces discussions parsemées de blagues.

Un grand merci à Véronique pour ta présence, ton soutien et ton écoute.

Sans oublier de remercier les autres membres de l'équipe : Christine, Cyril, Ludivine et Sonia, pour votre gentillesse et votre bonne humeur.

Je remercie bien évidemment tous les étudiants qui ont partagés, à un moment, le navire avec moi : Ahlam, Aimée, Aïna, Alexandre, Amandine, Anaïs Ba., Anaïs Bl., Asmaa, Ava, Bénédicte, Camille, Cédric, Christelle, Damien, Emilie, Gilles, Jean-Baptiste, Justine, Karima, Laura, Marie-Elodie, Mathilde, Radhia, Selven, Susanna et Yonca.

Ahlam et Camille, je vous remercie pour votre aide, vos conseils scientifiques et votre gentillesse. Travailler avec vous a été un véritable plaisir et vos départs successifs m'auront laissés un grand vide. La boutique n'aura d'ailleurs plus jamais été la même sans toi Ahlam...

Alexandre et Emilie, mes compagnons depuis le Master, ceux avec qui j'ai vécu tous les moments importants d'une thèse. Je tiens à vous remercier pour votre soutien et votre aide, sans vous cette thèse n'aurait sans doute pas été la même.

Bénédicte, parce qu'il y a des rencontres qui semblent évidentes. J'aurais aimé que tu restes quotidiennement au laboratoire, mais ta présence les lundis aura été pour moi une véritable bouffée d'oxygène.

Un merci particulier à Anaïs, Christelle, Gilles, Laura et Susanna pour votre écoute, votre soutien et pour tous ces moments de décompression et de bonne humeur. Gilles j'entends encore ton rire, si discret, raisonner dans ma tête !

Parce que cette thèse n'aurait tout simplement pas été possible sans mes proches,

A Pauline, mon binôme du CP jusqu'à la thèse. Je te remercie pour ta présence depuis toutes ces années et pour ton immense soutien. Je n'oublie évidemment pas de remercier ceux qui font ton bonheur, Adrien et Agathe, avec qui c'est toujours un véritable plaisir de passer du temps.

A mes Nancéiens préférés : Céline, Justine, Laura, Matthieu et Nicolas avec qui malgré la distance rien n'a jamais changé. J'ai toujours pu compter sur vous et je vous remercie pour votre soutien depuis toutes ces années et pour ces week-ends qui m'auront permis de déconnecter l'espace d'un instant.

A mes plus belles rencontres Strasbourgeoises : Alicia, Coralie, Elise, Jeremy et Sébastien. Je vous remercie pour tous ces moments partagés et ces belles soirées. Bien évidemment, une mention toute particulière pour Elise et Jeremy avec qui tout a commencé à Strasbourg et sans qui ces années Strasbourgeoises n'auraient tout simplement pas été aussi belles.

A Maxime, parce qu'il y a des rencontres qui changent une vie, je te remercie d'être entré dans ma vie et d'être présent à mes côtés à chaque instant. Je ne te remercierai jamais assez pour tout ce que tu m'apportes et pour ton soutien inconditionnel, surtout tout au long de ces derniers mois.

A ma famille, sans qui je ne serais pas celle que je suis aujourd'hui, sans qui je ne serais pas arrivée jusque là et sans qui tout ça n'aurait tout simplement pas été possible.

A mes grands-parents, pour qui j'ai une pensée toute particulière.

A Loïc, qui a toujours été pour moi un véritable modèle, je te remercie pour tout ce que tu m'apportes et d'être, avec Julie, toujours présents pour moi.

Papa, j'espère par ce travail pouvoir te rendre fier.

Maman, merci d'être mon plus précieux soutien depuis toutes ces années.

Sommaire

INTRODUCTION	1
I- L'épithélium intestinal	3
1. Structure et fonction de l'intestin	3
2. Aspects cellulaires de l'épithélium intestinal.....	5
2.1 Les cellules souches intestinales	5
2.2 Les cellules intestinales progénitrices	6
2.3 Les cellules intestinales différenciées	7
3. Homéostasie intestinale.....	9
3.1 La voie WNT.....	9
3.1.1 Description des voies WNT	9
3.1.2 Les modulateurs des voies WNT	14
3.1.3 La voie WNT canonique dans l'intestin	17
3.2 La voie NOTCH.....	18
3.3 La voie HIPPO/YAP.....	20
3.4 La voie BMP	23
3.5 La voie HEDGEHOG.....	23
II- Les pathologies intestinales	27
1. Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin.....	27
1.1 Généralités.....	27
1.2 La physiopathologie des MICI.....	28
1.2.1 Les facteurs génétiques	28
1.2.2 Les facteurs environnementaux.....	28
1.2.3 Les facteurs immunologiques	29
2. Les cancers colorectaux.....	31
2.1 Epidémiologie et classification anatomopathologique	31
2.1.1 Epidémiologie et facteurs de risques.....	31
2.1.2 Classification histologique.....	33
2.2. Altérations chromosomiques dans les CCR.....	35
2.2.1 Les CCR de type CIN	35
2.2.2 Les CCR de type MSI.....	37
2.2.3 Les CCR de type CIMP	38
2.2.4 Les autres formes héréditaires de CCR	39
2.3. Traitements des cancers colorectaux.....	40
2.3.1 La chirurgie.....	40
2.3.2 La chimiothérapie	40
2.3.3 Les thérapies ciblées	41
2.3.4 La résistance aux traitements	41
2.4 Survie globale des patients.....	42

Sommaire

III- La superfamille des Cadhérines	43
1. Généralités	43
1.1 Les Cadhérines classiques.....	45
1.2 Les Cadhérines desmosomales.....	48
1.3 Les Protocadhérines	48
1.4 Les Cadhérines atypiques	49
2. Cadhérines et cancers	49
IV- La Cadhérine atypique MUCDHL	53
1. Généralités	53
1.1 Structure de MUCDHL	53
1.2 Expression et régulation de MUCDHL	55
2. Fonction et mode d'action de MUCDHL	57
OBJECTIFS.....	61
RESULTATS	64
Projet I	65
I- Résumé des résultats obtenus.....	66
II - Publication.....	70
Projet II	107
I- Résumé des résultats obtenus.....	108
II- Publication	111
DISCUSSION	143
I - Discussion générale et perspectives	144
1. Expression de MUCDHL lors de la cancérogenèse colique	144
2. Conséquences de la perte d'expression de MUCDHL pour la cancérogenèse colique	145
2.1 Aspects physiopathologiques	145
2.2 Aspects cellulaires et moléculaires.....	147
3. Mode d'action moléculaire de MUCDHL dans les cellules cancéreuses colique.....	149
3.1 Caractérisation du mécanisme d'inhibition de la β -caténine.....	149
3.2 Identification de protéines interagissant avec MUCDHL	150
II- Conclusion générale.....	154
BIBLIOGRAPHIE	
PUBLICATIONS & COMMUNICATIONS	

Liste des Figures

Chapitre I : L'épithélium intestinal

Figure 1. Structure de l'intestin grêle et du côlon _____	2
Figure 2. Représentation schématique de l'épithélium de l'intestin grêle et du côlon. _____	4
Figure 3. Représentation schématique de la voie de signalisation WNT canonique. _____	10
Figure 4. Représentation schématique de la voie de signalisation WNT/PCP. _____	12
Figure 5. Effets du récepteur à l'EGF sur l'activité transcriptionnelle de la β -Caténine. _____	16
Figure 6. Représentation schématique de la voie de signalisation NOTCH. _____	19
Figure 7. Représentation schématique de la voie de signalisation HIPPO/YAP. _____	21
Figure 8. Représentation schématique de la voie de signalisation BMP. _____	22
Figure 9. Représentation schématique de la voie de signalisation HEDGEHOG. _____	24

Chapitre II : Les pathologies intestinales

Figure 10. Localisation des lésions inflammatoires dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin : maladie de Crohn vs rectocolite hémorragique. _____	26
Figure 11. Représentation schématique et critères d'évaluation des différents stades tumoraux. ____	32
Figure 12. Développement d'un adénocarcinome colique selon le modèle de Fearon et Vogelstein. _____	34

Chapitre III : La superfamille des Cadhérines

Figure 13. Les différentes classes de la superfamille des Cadhérines. _____	44
Figure 14. Structure des Cadhérines classiques et interaction de leur domaine cytoplasmique. ____	46

Chapitre IV : La Cadhérine atypique MUCDHL

Figure 15. Représentation schématique des isoformes MUCDHL L et M. _____	52
Figure 16. Expression de MUCDHL dans l'épithélium intestinal humain. _____	54

Abréviations

- A -

ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ADNc	ADN complémentaire
ADAM	A Disintegrin And Metalloprotease domain
AIS	Segments initiaux des axones
ANK3	ANKYRIN 3
APC	Adenomatous Polyposis Coli
APH1	Anterior pharynx-defective 1
AREG	Amphiregulin
ARN	Acide RiboNucléique
Arg	Arginine
Asn	Asparagine
Asp	Aspartate

- B -

BAX	BCL2-associated X protein
BCL2	B-Cell Lymphoma 2
BIRC5	Baculoviral IAP Repeat-Containing Protein 5
Bmi1	B lymphoma Mo-MLV insertion region 1 homolog
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BMPR	Bone Morphogenetic Protein Receptor
β -TrCP	β -Transducing Repeat-Containing Protein

- C -

α -CAT	α -CATENIN
β -CAT	β -CATENIN
Ca ²⁺	ions Calcium
CaMKII	Calcium calmodulin-dependent protein kinase II
CBC	Crypt Base Columnar cells
CBF1	C-promotor Binding Factor 1

Abréviations

CCR	Cancer Colorectal
CDH	CADHERIN
CDHR	CADHERIN Related
CDK	Cyclin-Dependent Kinase
CDX2	Caudal-type Homeobox 2
CIMP	CpG Island Methylator Phenotype
CIN	Chromosomal Instability
CIR	CBF1 Interacting Co-repressor
CK1	Caseine Kinase 1
COX	Cyclo-oxygénase
CREB	cAMP Response Element-Binding protein
CSL	CBF1 Suppressor of haules LAG1
CTGF	Cystein-rich protein connective Tissue Growth Factor

- D -

DHH	Desert hedgehog
DKK	Dickkopf
DLL	Delta-like protein
DSH	Dishevelled
DSC	Desmocollines
DSG	Desmogléines

- E -

E16,5	Jour embryonnaire 16,5
EC	Extracellular Cadherin
E-cadhérine	Epithelial cadherin
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
ERK1/2	Extracellular signal-regulated kinase 1/2

Abréviations

- F -

FGF Fibroblast Growth Factor

FZD Frizzled

- G -

GDP Guanosine DiPhosphate

GFP Green Fluorescent Protein

GLI Glioma-associated transcription factor

Glu Glutamate

GRB2 Growth Factor Receptor Bound protein 2

GRK2 G protein-coupled Receptor Kinase 2

GSK3 β Glycogen Synthase Kinase 3 β

GTP Guanosine TriPhosphate

- H -

HDAC Histone Deacetylase

HES Hairy/enhancer of split

HER Human EGF Receptor related

HERP/HEY HES-related repressor proteins with Y-box

HH HEDGEHOG

HHIP HEDGEHOG Interacting Protein

HIF Hypoxia Inductible Factor

HNF4 Hepatocyte Nuclear factor 4

HNPCC Hereditary Non Polyposis Colorectal Cancer

- I -

ID1-3 Inhibitor of differentiation 1-3

IHH Indian Hedghoh

IL2 Interleukine 2

IL2r IL2 receptor

IP Immunoprecipitation

Abréviations

IP3 Inositoltriphosphate

- J -

JNK c-Jun N-terminal Kinase

- L -

LATS1/2 Large Tumor Suppressor Kinases 1/2

LEF Lymphoid Enhancer-binding Factor 1

Leu Leucine

LGR5 Leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5

LI-cadhérine Liver Intestine cadherin

LRC Label Retaining Cells

- M -

MAML Mastermind-Like

MAP MUTYH Associated Polyposis

MAPK Mitogen Activated Protein Kinase

MATH Mammalian atonal homolog

MASH Mammalian achaete-scute homolog

MDCK Madin Darby Canine Kidney

MEK MAPK-ERK-Kinase

MGMT O-6-Methylguanine-DNA Methyltransferase

MICI Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin

MLH MutL homolog

MMR MisMatch Repair

MSI Microsatellite Instability

MSH Mut S Homolog

MST1/2 Mammalian Ste20-look Protein Kinase 1/2

mTOR Mammalian Target Of Rapamycin

MUCDHL Mucin and cadherin-like

MUTYH Mut Y Homolog

Abréviations

MYC Myelocytomatosis oncogene

- N -

N-cadhérine Neuronal-cadherin

NFAT Nuclear factor Associated with T cells

NF-κB Nuclear Factor- κB

NICD Notch Intra-Cellular Domain

NOD2 Nucleotide-binding oligomerization Domain 2

- O -

OLFM4 Olfactomedin-4

- P -

PAF Polyposis Adenomatous Familial

P-cadhérine Placental cadherin

PCDH Protocadherin

PCP Planar Cell polarity

PCR Polymerase Chain Reaction

PDK1 Phosphatidylinositol 3-Dependent Kinase 1

PDZ Postsynaptic density protein / Drosophila disc large tumor suppressor / Zonula occludens-1 protein

PEN2 Presenilin enhancer 2

PI3K Phosphatidyl Inositol 3 Kinase

PKA Protein Kinase A

PKC Protein Kinase C

PLC Phospholipase C

PMS Postmeiotic segregation

PPAR Peroxisome Proliferator Activated Receptor

Pro Proline

PTB PhosphoTyrosine Binding

PTCH Patched

PTEN Phosphatase and Tensin homologue deleted on chromosome 10

Abréviations

- R -

RAPTOR	Regulatory-associated protein of m-TOR
RBPJk	Recombination signal Binding Protein for immunoglobulin Kappa J region
R-cadhérine	Retinal cadherin
RICTOR	Regulatory-insensitive companion of m-TOR
ROCK	Rho-associated Kinase
RT	Reverse Transcription

- S -

Ser	Serine
SH2	Src Homology domain 2
SH3	Src Homology domain 3
SHARP	SMRT and HADAC associated Repressor Protein
siRNA	small interfering Ribonucleic Acid
SMAD	Mothers Against Decapentaplegic homolog
SMO	Smoothened
SMRT	Silencing Mediator of Retinoid and Thyroid Hormone receptor
STK11	Serine / Threonine Kinase 11

- T -

T-cadhérine	Third Adiponectin Receptor
TBX5	T-box transcription factor-5
TCF	T-cell Factor
TEAD1-4	TEA Domain family member 1-4
TGF β	Transforming Growth Factor β
TGF β R2	TGF β Receptor 2
Thr	Thréonine
TLR	Tool Like Receptor
TM	Trans-Membrane Domain
TSC2	Tuberous Sclerosis Complex 2

Abréviations

Tyr Tyrosine

- V -

VE-cadhérine Vascular endothelial cadherin

VEGF Vascular Endothelial Growth Factor

VHL Von Hippel Lindau

- W -

WNT Wingless-type MMPTV integration site

WT Wild type

- Y -

YAP1 Yes-Associated Protein 1

- Z -

ZEB1 Zinc finger E-box-binding homeobox

INTRODUCTION

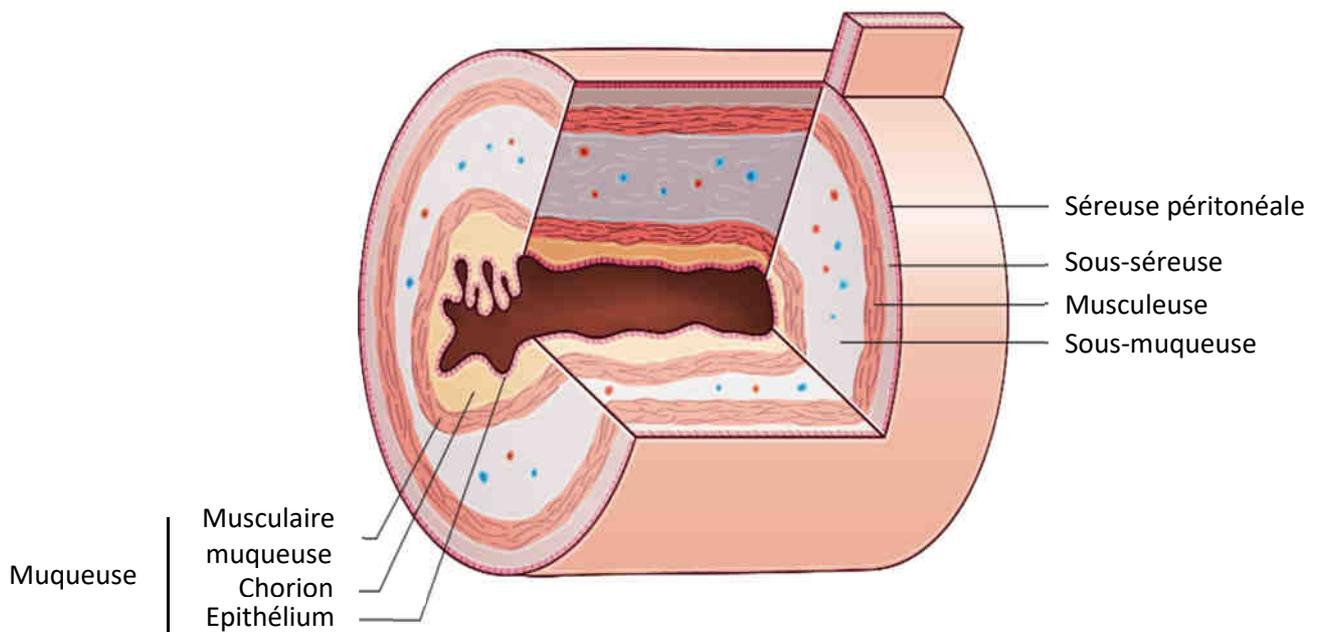


Figure 1. Structure de l'intestin grêle et du côlon

La cavité centrale de l'intestin, appelée lumière intestinale, est recouverte de quatre tuniques concentriques. La première tunique située face à la lumière intestinale correspond à la muqueuse. Celle-ci est composée d'un épithélium prismatique et unistratifié reposant sur un tissu conjonctif lâche nommé chorion ou *lamina propria*, et d'une couche musculaire. La seconde tunique est la sous-muqueuse comportant des vaisseaux sanguins, des vaisseaux lymphatiques et des fibres nerveuses. La troisième tunique est la musculature permettant d'assurer le péristaltisme intestinal. Elle est constituée d'une couche circulaire interne et d'une couche longitudinale externe de muscles lisses. La dernière tunique est la séreuse, formée du feuillet viscéral du péritoine, elle permet de protéger les organes de la cavité abdominale (D'après [Les fondamentaux de la pathologie digestive](#). © CDU-HGE/Éditions Elsevier-Masson., 2014).

Introduction

I- L'épithélium intestinal

1. Structure et fonction de l'intestin

L'appareil digestif est constitué d'une série d'organes creux et de glandes annexes. Le tractus digestif se compose successivement de l'œsophage, l'estomac, l'intestin et le rectum.

Chez les mammifères, l'intestin est composé de deux parties fonctionnellement distinctes que sont l'intestin grêle et le gros intestin. L'intestin grêle, constitué du duodénum, du jéjunum et de l'iléon, assure principalement la digestion et l'absorption des nutriments dans le sang. Le gros intestin comprenant le caecum, le côlon proximal, le côlon distal et le rectum, assure quant à lui la condensation et la déshydratation des déchets de la digestion.

D'un point de vue histologique, la paroi intestinale est formée de quatre tuniques concentriques qui recouvrent la cavité centrale de l'intestin appelée lumière intestinale. La première tunique située face à la lumière intestinale est la muqueuse. Elle est composée d'un épithélium de revêtement reposant sur un tissu conjonctif, nommé chorion et d'une couche musculaire. La seconde tunique correspond à la sous-muqueuse comportant des vaisseaux sanguins et lymphatiques, ainsi que des fibres nerveuses. La troisième tunique, appelée musculuse est constituée de deux couches de muscles lisses, une couche circulaire interne et une couche longitudinale externe, qui vont permettre d'assurer le péristaltisme de l'intestin et la progression du bol alimentaire. Enfin, la dernière tunique de l'intestin est la séreuse. Cette dernière est formée du feuillet viscéral du péritoine et va permettre la séparation de l'intestin et de la cavité abdominale (**Figure 1**). Afin d'optimiser l'absorption des nutriments, la muqueuse de l'intestin grêle forme de nombreux replis qui présentent des invaginations appelées cryptes de Lieberkühn et des expansions en doigt de gant nommées villosités. La muqueuse du côlon comporte quant à elle des cryptes particulièrement profondes, mais est dépourvue de villosités.

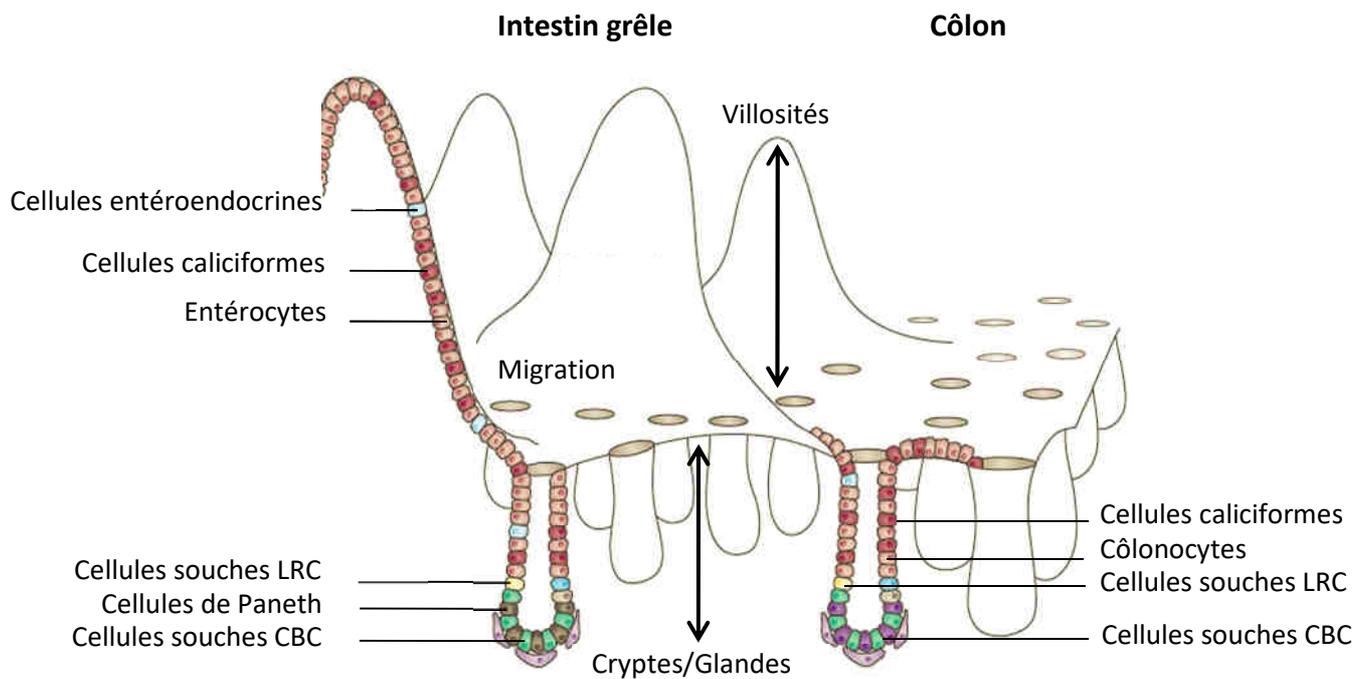


Figure 2. Représentation schématique de l'épithélium de l'intestin grêle et du côlon.

L'épithélium de l'intestin grêle présente des invaginations glandulaires nommées cryptes ou glandes et des expansions en doigt de gant appelées villosités. Au niveau de l'intestin grêle, les cellules souches CBC situées au fond des cryptes génèrent des cellules de transit qui vont proliférer et se différencier, soit en cellules de Paneth qui résident au fond des cryptes, soit en cellules entéro-endocrines, cellules calciformes et entérocytes qui migrent le long de l'axe crypto-villositaire et seront rapidement éliminées dans la lumière intestinale lorsqu'elles atteignent le sommet des villosités. Le côlon est tapissé d'un épithélium de surface plat pourvu uniquement de glandes, dont les cellules souches CBC donnent essentiellement lieu à des cellules calciformes et des côlonocytes. Les cellules souches LRC positionnées en position +4 correspondent à des cellules souches de réserve (D'après Vermeulen & Snipert., 2014).

Introduction

2. Aspects cellulaires de l'épithélium intestinal

L'épithélium de revêtement de l'intestin est un épithélium prismatique et unistratifié constitué de cellules souches, de cellules progénitrices et de cellules différenciées permettant d'assurer les différentes fonctions de l'intestin (ex. absorption des nutriments, sécrétion de mucus, barrière physiologique...), ainsi que son constant renouvellement cellulaire (**Figure 2**).

2.1 Les cellules souches intestinales

L'épithélium intestinal est le siège d'un renouvellement cellulaire intense et continu qui repose sur de fortes activités de prolifération et de différenciation cellulaire. Les cellules souches définies par leur capacité d'auto-renouvellement et leur multipotence sont localisées au niveau des cryptes intestinales.

Dans les années 1970, des premiers travaux concernant la localisation des cellules souches intestinales ont été menés. Ces travaux proposaient une localisation des cellules souches intestinales autour de la position +4 depuis le fond des cryptes, c'est à dire immédiatement au-dessus des cellules de Paneth (*cf § 1.2.3*). Ces cellules en position +4 sont décrites comme sensibles aux radiations et se caractérisent par la rétention d'ADN marqué témoignant d'une ségrégation asymétrique des brins d'ADN matrice et néo-synthétisés entre les cellules souches et leur descendance, d'où leur appellation "Label Retaining Cells" (LRC). Cependant, il n'existait pas de preuves que ces cellules souches Bmi1⁺ soient capables de générer tous les types cellulaires différenciés de l'épithélium intestinal (*Potten et al., 1974 ; Potten et al., 1977*).

D'autres travaux ont depuis été conduits et ont permis d'identifier une population distincte de cellules souches intestinales. En effet, l'analyse histologique des cryptes intestinales montre l'existence, au fond des cryptes, de cellules situées entre les cellules de Paneth. Les travaux menés ont mis en évidence que ces cellules appelées "Crypt Base Columnar cells"

Introduction

(CBC), sont à l'origine de tous les types cellulaires différenciés de l'épithélium intestinal. Les auteurs ont donc émis l'hypothèse que les cellules CBC correspondent aux cellules souches intestinales. Un marqueur des cellules CBC est le récepteur LGR5 (Leucin-rich G protein-coupled receptor 5) dont l'expression est détectée uniquement dans ces cellules. (Cheng & Leblond., 1974 ; Barker *et al.*, 2007). Le gène *Lgr5* code pour un récepteur de la R-spondin qui potentialise l'activation de la voie WNT nécessaire au maintien et à la fonction des cellules CBC (Carmon *et al.*, 2011). La preuve définitive que les cellules CBC correspondent aux cellules souches intestinales a été apportée il y a quelques années, en montrant qu'une cellule *Lgr5*⁺ unique placée dans un milieu de culture approprié peut générer des organoïdes intestinaux : ceux-ci récapitulent l'organisation crypto-villositaire de l'épithélium intestinal comprenant le compartiment des cellules *Lgr5*⁺ associées aux progéniteurs prolifératifs et le compartiment de différenciation incluant toutes les cellules différenciées absorbantes et sécrétrices (Sato *et al.*, 2009).

De manière intéressante, il a été montré que la perte des cellules *Lgr5*⁺ entraîne une augmentation de la population des cellules *Bmi1*⁺, conduisant à la restauration du compartiment de cellules souches intestinales *Lgr5*⁺ (Tian *et al.*, 2011 ; Yan *et al.*, 2012). Ceci indique qu'il existe au niveau de l'épithélium intestinal deux populations de cellules souches aux rôles différents. Les cellules CBC (*Lgr5*⁺) qui se divisent très activement représentent les "véritables" cellules souches intestinales qui assurent le renouvellement permanent de l'épithélium tandis que les cellules LRC (*Bmi1*⁺) en position +4 sont considérées comme des cellules souches de réserve. L'homéostasie de la crypte intestinale repose sur un équilibre dynamique entre les cellules souches actives (CBC) et les cellules souches de réserve (LRC).

2.2 Les cellules intestinales progénitrices

Les cellules souches intestinales génèrent constamment des cellules progénitrices. Ces cellules à division rapide vont subir une différenciation fonctionnelle selon un axe crypto-villositaire. La majorité des cellules de transit ainsi générées progressent jusqu'au sommet des villosités, avant de mourir par anoïkis et d'être éliminées dans la lumière intestinale (Hall

Introduction

et al., 1994 ; Marshman *et al.*, 2002). Chez la souris, chaque jour, environ 200 cellules progénitrices sont générées par crypte (Reya & Clevers., 2005).

2.3 Les cellules intestinales différenciées

Il existe différents types de cellules différenciées au sein de l'épithélium intestinal que l'on peut regrouper en deux catégories qui sont les cellules absorbantes et les cellules sécrétrices. Le lignage absorbant est composé des entérocytes/côlonocytes. Le lignage sécréteur est constitué des cellules caliciformes, des cellules entéro-endocrines, des cellules de Paneth et des cellules à touffe.

Les entérocytes représentent plus de 80 % des cellules de l'épithélium de l'intestin grêle, tandis que les côlonocytes représentent environ 50 % des cellules épithéliales du côlon. Les entérocytes et les côlonocytes sont des cellules absorbantes hautement polarisées avec d'une part un pôle basal comprenant un noyau ovale et un appareil de Golgi ; et d'autre part, un pôle apical regroupant les mitochondries et de nombreuses microvillosités recouvertes d'un réseau fibrillaire superficiel, le glycocalyx, riche en glycoprotéines et en enzymes digestives. En effet, l'apex des entérocytes est recouvert d'une couche organisée de protrusions membranaires formant une structure particulière appelée bordure en brosse. Celle-ci est le site primaire de l'absorption intestinale et confère aux cellules une large surface d'échange. Les microvillosités comportent des enzymes, des transporteurs et des canaux assurant la digestion et le passage sélectif des nutriments dans les vaisseaux sanguins et lymphatiques. Par ailleurs, l'étude protéomique de la bordure en brosse intestinale a permis de mettre en évidence la présence de protéines impliquées dans la signalisation cellulaire comme les substrats de la voie du récepteur à l'EGF (EGFR), mais aussi dans l'adhésion cellulaire avec l'E-cadhérine et MUCDHL. En outre, si l'EGFR est principalement situé sur la membrane basolatérale des entérocytes, il peut partiellement être relocalisé dans la bordure en brosse lors de phénomènes de régénération cellulaire (Hussain., 2014 ; Ziv & Bendayan., 2000 ; McConnell *et al.*, 2011 ; Avissar *et al.*, 2000).

Introduction

Les cellules caliciformes appelées également cellules à mucus ou cellules en gobelet représentent environ 5 % des cellules épithéliales de l'intestin grêle. Elles ont une proportion qui augmente de façon proximo-distale, et représentent ainsi environ 15 % des cellules épithéliales du côlon distal. Ces cellules synthétisent et sécrètent des glycoprotéines de haut poids moléculaire, les mucines, qui forment le mucus intestinal. Les mucines sécrétées par les cellules caliciformes sont le composant principal du mucus, lui conférant sa viscoélasticité. En plus des mucines, le mucus est également composé d'eau, d'immunoglobulines et de peptides microbiens. La couche de mucus est un élément essentiel qui tapisse l'ensemble de l'épithélium intestinal le protégeant des agressions mécaniques, chimiques et microbiennes (Kim & Ho., 2010 ; Kim & Khan., 2013).

Les cellules entéro-endocrines représentent moins de 1 % des cellules de l'épithélium intestinal. Elles produisent des hormones (Sérotonine, Motiline, Sécrétine, ...) qui régulent la satiété, la motilité, l'immunité et l'inflammation. Ces hormones sont contenues dans des vésicules de sécrétion localisées dans la partie basale de la cellule et sont déversées dans la circulation sanguine en réponse à des stimuli variés (Noah *et al.*, 2011 ; Gunawardene *et al.*, 2011).

Les cellules de Paneth sont des cellules différenciées, mais situées au fond des cryptes de l'intestin grêle et sont absentes dans le côlon. Contrairement aux autres cellules intestinales différenciées qui ont une durée de vie courte de 4 à 6 jours, les cellules de Paneth ont une durée de vie beaucoup plus longue d'environ 30 jours. Ces cellules représentent environ 8 % des cellules épithéliales, et 5 à 12 cellules de Paneth sont présentes par crypte. Elles interviennent dans la réponse immunitaire innée de l'intestin en synthétisant et sécrétant des molécules à action anti-microbienne telles que le Lysozyme et les Défensines (Ayabe *et al.*, 2000; Clevers & Bevins., 2013). Elles contribuent également à la niche des cellules souches intestinales et participent à leur maintien (Sato *et al.*, 2011).

Les cellules à touffe, également appelées « Tuft cells » représentent 0.4 % des cellules épithéliales intestinales. Elles sont caractérisées par une morphologie particulière avec une

Introduction

bordure en brosse hyperdéveloppée dans la région apicale. Ces cellules expriment des enzymes de synthèse des prostaglandines telles que les cyclo-oxygénases COX-1 et COX-2 leur suggérant un rôle dans l'inflammation et la perception de la douleur (Gerbe *et al.*, 2011 ; Gerbe *et al.*, 2012). Des études récentes ont mis en évidence, l'implication de ces cellules dans la réponse immune de type-2 qui est impliquée dans la défense antiparasitaire et les phénomènes d'allergie (Howitt *et al.*, 2016 ; Gerbe *et al.*, 2016).

D'autres cellules sont retrouvées dans l'épithélium intestinal comme les cellules M qui recouvrent les plaques de Peyer. Ces cellules participent à la réponse immunitaire en endocytant les antigènes présents dans la lumière intestinale afin de les présenter aux cellules présentatrices d'antigènes sous-jacentes (Kucharzik *et al.*, 2000 ; Miller *et al.*, 2007).

3. Homéostasie intestinale

Le renouvellement permanent de l'épithélium intestinal requiert une coordination spatio-temporelle précise des différents processus cellulaires via des voies de signalisation. Les voies principales au niveau de l'intestin sont les voies WNT, NOTCH, BMP, HEDGEHOG et HIPPO/YAP dont les activités conduisent à l'expression de nombreux gènes impliqués dans la prolifération cellulaire, la migration, la spécification des différents lignages, l'adhésion cellulaire ou encore l'apoptose.

3.1 La voie WNT

3.1.1 Description des voies WNT

Les facteurs WNT sont des glycoprotéines sécrétées riches en Cystéine qui jouent un rôle crucial dans l'homéostasie intestinale en régulant le maintien des cellules souches, la prolifération des cellules progénétrices, la polarisation cellulaire, la différenciation des cellules de Paneth et l'apoptose. Il existe chez l'Homme 19 ligands WNT et 10 récepteurs FRIZZLED (FZD) (Niehrs., 2012).

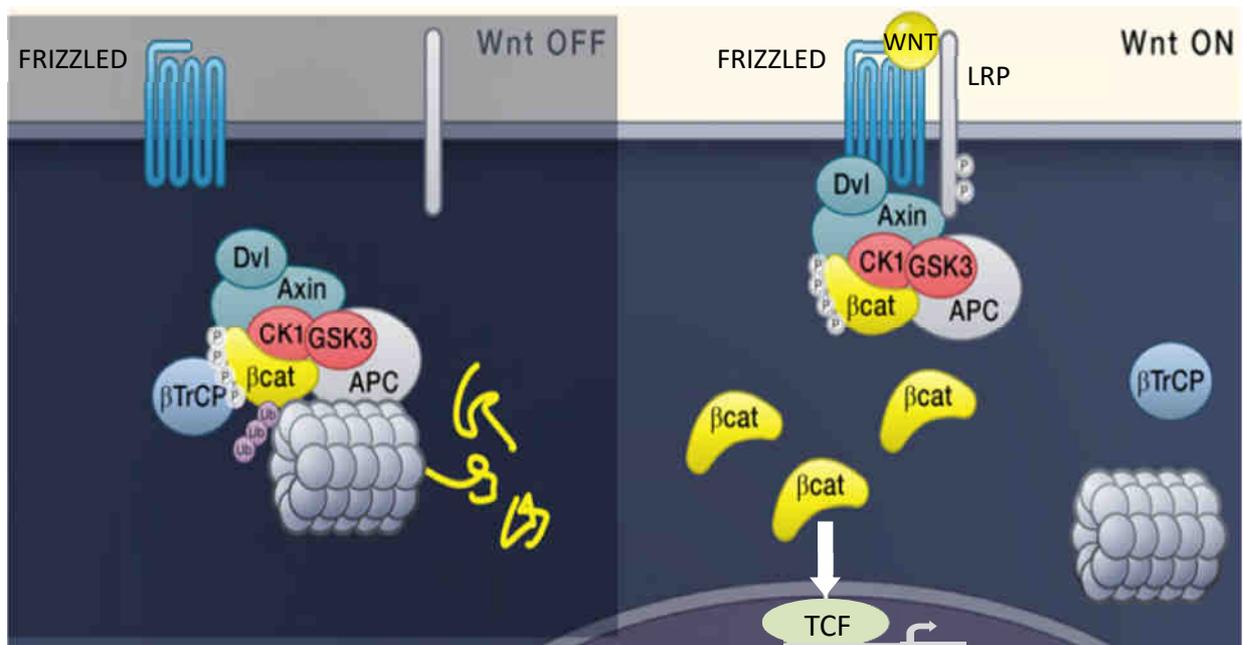


Figure 3. Représentation schématique de la voie de signalisation WNT canonique.

En absence d'activation de la voie WNT, la β -caténine cytoplasmique est dégradée par le protéasome après avoir été phosphorylée et poly-ubiquitinée par un complexe protéique composé des protéines AXINE, APC, CK1 et GSK3 β . Au contraire, la fixation d'un ligand WNT à son récepteur FRIZZLED associé au co-récepteur LRP aboutit à l'inhibition du complexe de dégradation et à la translocation nucléaire de la β -caténine. En se fixant sur TCF, la β -caténine déplace le co-represseur GROUCHO et permet l'expression des gènes cibles de TCF (D'après [Clevers et al., 2014](#)).

Introduction

De façon générale, la liaison des protéines WNT au récepteur FZD peut conduire à l'activation de trois voies de signalisation : la voie WNT/ β -caténine canonique, et les voies non canoniques WNT/PCP (Planar Cell Polarity) et WNT/ Ca^{2+} indépendantes de l'activité transcriptionnelle de la β -caténine.

3.1.1.1 La voie WNT/ β -caténine canonique

L'élément central de la transmission du signal WNT canonique est la protéine β -caténine. Dans les cellules épithéliales, cette protéine est essentiellement présente à la membrane des cellules, dans les complexes d'adhésion intercellulaires au niveau desquels elle interagit notamment avec l'E-cadhérine. En absence d'activation de la voie WNT, la β -caténine cytoplasmique non mobilisée dans les complexes jonctionnels est prise en charge par un complexe de dégradation composé des protéines d'échafaudage telles que APC et Axine et de kinases comme CK1 et GSK3 β . La phosphorylation de la β -caténine sur la Sérine 45 par CK1, puis sur les résidus Sérine 33, Sérine 37 et Thréonine 41 par GSK3 β , entraîne son ubiquitination par l'E3 Ubiquitine ligase β -TrCP puis sa dégradation par le protéasome. La voie WNT canonique est activée par la fixation d'un ligand WNT à son récepteur à 7 domaines transmembranaires FZD et au co-récepteur LRP5/6. La liaison du ligand WNT à FZD conduit au recrutement à la membrane de la protéine cytoplasmique DSH. Ceci entraîne le recrutement membranaire de la protéine Axine et du complexe de dégradation. Le recrutement à la membrane de l'Axine conduit à sa dégradation, favorisant la destruction du complexe de dégradation de la β -caténine. L'activation de DSH permet également l'inhibition de GSK3 β , entraînant une diminution de la phosphorylation de la β -caténine. La β -caténine n'étant plus dégradée, elle s'accumule dans le cytoplasme avant d'être transloquée dans le noyau (Clevers., 2006). Une fois dans le noyau, la β -caténine déplace le co-répresseur transcriptionnel GROUCHO et agit comme un co-activateur transcriptionnel en formant un complexe avec les facteurs TCF/LEF afin d'activer la transcription de très nombreux gènes cibles impliqués notamment dans la prolifération cellulaire (*MYC* et *CYCLINE D1*) (He *et al.*, 1998 ; Tetsu & McCormick., 1999), et dans la migration cellulaire (*EPHB* et *ZEB1*) (Batlle *et al.*, 2002 ; Sanchez-Tillo *et al.*, 2015) (Figure 3).

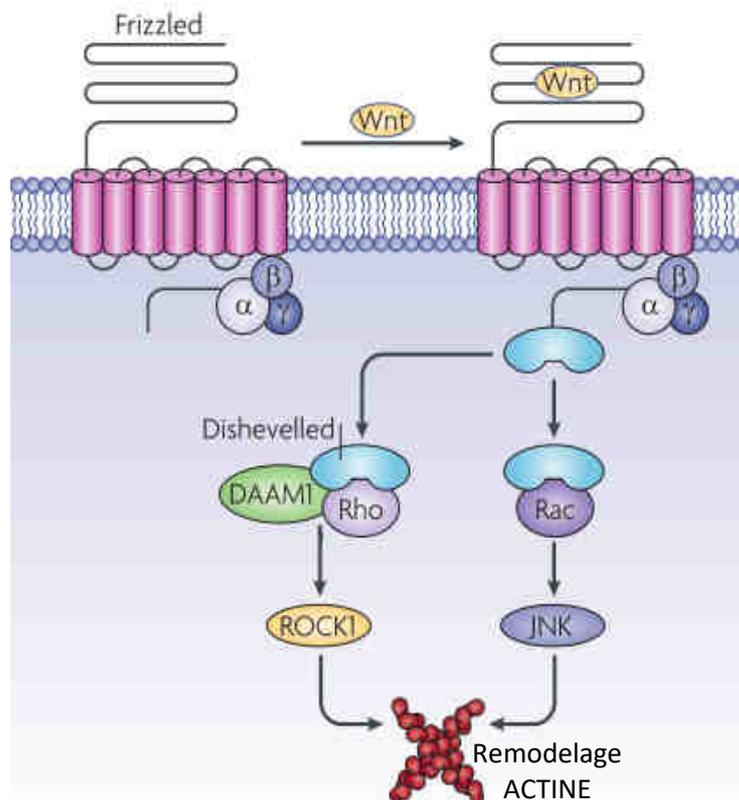


Figure 4. Représentation schématique de la voie de signalisation WNT/PCP.

La liaison d'un facteur WNT à son récepteur FRIZZLED conduit au recrutement membranaire du facteur DISHEVELLED et à l'activation des kinases ROCK1 et JNK par le biais de l'activation respective des GTPases RHO et RAC. L'activation de la voie WNT/PCP conduit au remodelage du cytosquelette d'ACTINE (D'après [Angers & Moon., 2009](#)).

Introduction

Le mécanisme clé de la régulation de la voie WNT/ β -caténine réside en la phosphorylation amino-terminale de la β -caténine, entraînant la dégradation protéasomale de cette dernière. Néanmoins, l'accumulation de la β -caténine dans le cytoplasme et le noyau peut également mettre en jeu d'autres mécanismes ciblant directement la β -caténine. En effet, il a été montré *in vitro* et *in vivo* qu'AKT activé entraîne la phosphorylation de la β -caténine au niveau de son résidu Sérine 552, conduisant à la dissociation de la β -caténine au niveau des complexes membranaires. Cette phosphorylation du résidu Sérine 552 entraîne donc l'augmentation de la β -caténine dans le cytoplasme et le noyau des cellules de façon indépendante de la voie WNT/ β -caténine canonique (Fang *et al.*, 2007).

3.1.1.2 Les voies WNT non canoniques

Les voies WNT non canoniques sont beaucoup moins caractérisées que la voie WNT canonique. Néanmoins, plusieurs voies non canoniques ont été identifiées : les voies WNT/PCP et WNT/ Ca^{2+} . Ces voies WNT non canoniques sont indépendantes de l'activité de la β -caténine et sont activées par les facteurs WNT4, WNT5a et WNT11.

La voie WNT/PCP intervient d'une part dans la polarisation cellulaire planaire par laquelle les cellules épithéliales s'orientent perpendiculairement à l'axe de polarité apico-basal, et contrôle d'autre part les mouvements cellulaires au cours de la gastrulation et de la fermeture du tube neural de tous les vertébrés (Roszko *et al.*, 2009). Cette voie est activée suite à la liaison d'un ligand WNT sur un récepteur FZD, conduisant au recrutement de la protéine DSH au niveau de la membrane par le biais des protéines Strabismus, Prickle, Flamingo et Diego. Ceci aboutit à l'activation des protéines RHO et RAC qui vont entraîner l'activation des kinases ROCK et JNK impliquées dans les réarrangements du cytosquelette d'Actine (Angers & Moon., 2009 ; Miller & McCrea., 2010) (Figure 4).

La voie WNT/ Ca^{2+} est quant à elle impliquée dans la polarisation dorso-ventrale, l'adhésion cellulaire, et les mouvements cellulaires au cours du développement. La liaison de WNT au récepteur FZD conduit au recrutement et à l'activation de protéines G. Il en résulte

Introduction

l'activation de la protéine DSH, puis de la PLC et la formation de DAG et d'IP3. En se fixant aux canaux calciques présents sur la membrane du réticulum endoplasmique, l'IP3 permet la libération et l'accumulation intracellulaire d'ions calcium à l'origine de l'activation de la kinase CaMKII. En outre, le flux de calcium et le DAG générés conduisent à l'activation de la kinase PKC. L'activation des kinases CaMKII et PKC permet l'activation des facteurs de transcription NF- κ B, NFAT, et CREB, induisant la transcription de nombreux gènes impliqués dans la migration cellulaire, l'organisation du cytosquelette, l'inflammation et l'adhésion cellulaire (De., 2011). La voie WNT/Ca²⁺ peut par ailleurs inhiber la voie WNT canonique en bloquant l'activité transcriptionnelle du complexe β -caténine/TCF via l'activation des kinases TAK1 et NLK par CaMKII (Kohn & Moon., 2005).

3.1.2 Les modulateurs des voies WNT

Les voies de signalisation WNT sont modulées par de nombreuses protéines pouvant se lier à WNT et à FZD (MacDonald *et al.*, 2009). Il existe différentes protéines antagonistes des voies WNT canonique et non canonique, mais les plus étudiées sont les sFRP qui se lient de façon spécifique aux ligands WNT et empêchent ainsi leurs liaisons aux récepteurs FZD. D'autres protéines comme les WIF sont également connues pour avoir un effet antagoniste sur les différentes voies WNT (Rattner *et al.*, 1997 ; Bovolenta *et al.*, 2008). En revanche, certaines protéines ont un effet antagoniste spécifique à la voie WNT canonique, comme par exemple, les membres de la famille Dickkopf et WISE/SOST (Krupnik *et al.*, 1999 ; Itasaki *et al.*, 2003). Des protéines comme Norrin et R-spondin sont connues quant à elles, pour stimuler la voie WNT canonique. Norrin interagit spécifiquement avec FZD4 et LRP5/6, entraînant une stimulation encore plus importante de la voie WNT/ β -caténine (Xu *et al.*, 2004). Les protéines R-spondin potentialisent aussi la voie WNT canonique et augmentent l'activité de cette dernière. Néanmoins, leur mécanisme d'action reste controversé. Certaines études montrent que cet effet potentialisateur passe par une liaison de la protéine R-spondin à FZD et LRP6 (Nam *et al.*, 2006), tandis que d'autres études suggèrent que la protéine R-spondin se lie à Kremen empêchant ainsi l'internalisation de LRP6 induite par Dickkopf/Kremen (Binnerts *et al.*, 2007). Dans les cryptes intestinales, il a été mis évidence que les protéines

Introduction

R-spondin accroissent les signaux WNT via leur interaction avec LGR4/5 et le complexe Frizzled-LRP5/6. La liaison des protéines R-spondin à LGR5 neutralise le complexe RNF43/ZNF43, conduisant au maintien des récepteurs FZD en surface et donc à l'augmentation de la signalisation WNT (de Lau *et al.*, 2011 ; de Lau *et al.*, 2014). Tout comme LGR4/5, le récepteur LGR6 est capable de potentialiser l'activation de la voie WNT en réponse aux R-spondin (Gong *et al.*, 2012).

Outre ces différents modulateurs, la voie WNT canonique peut être modulée de manière indirecte par des voies de signalisation. C'est le cas notamment de la voie du récepteur à l'EGF (EGFR) puisqu'il existe un lien étroit entre l'activation de l'EGFR et l'activité transcriptionnelle de la β -caténine.

En effet, l'activation de l'EGFR, entraîne d'une part, la phosphorylation activatrice d'AKT qui par phosphorylation inhibe la kinase GSK3 β . De ce fait, GSK3 β ne peut plus phosphoryler les résidus Sérine 33, Sérine 37 et Thréonine 41 de la β -caténine, diminuant ainsi sa dégradation. La β -caténine peut alors s'accumuler dans le cytoplasme, et être transloquée dans le noyau. A l'inverse, une inactivation de l'EGFR conduit à une diminution de la phosphorylation inhibitrice de GSK3 β , et donc à une augmentation de la dégradation de la β -caténine. D'autre part, l'activation de l'EGFR entraîne une phosphorylation de la β -caténine au niveau d'un résidu Tyrosine conduisant à la dissociation au niveau membranaire de l'interaction entre l'E-cadhérine et la β -caténine. Il en résulte une augmentation de la β -caténine cytoplasmique et nucléaire (Lee *et al.*, 2010) (**Figure 5**).

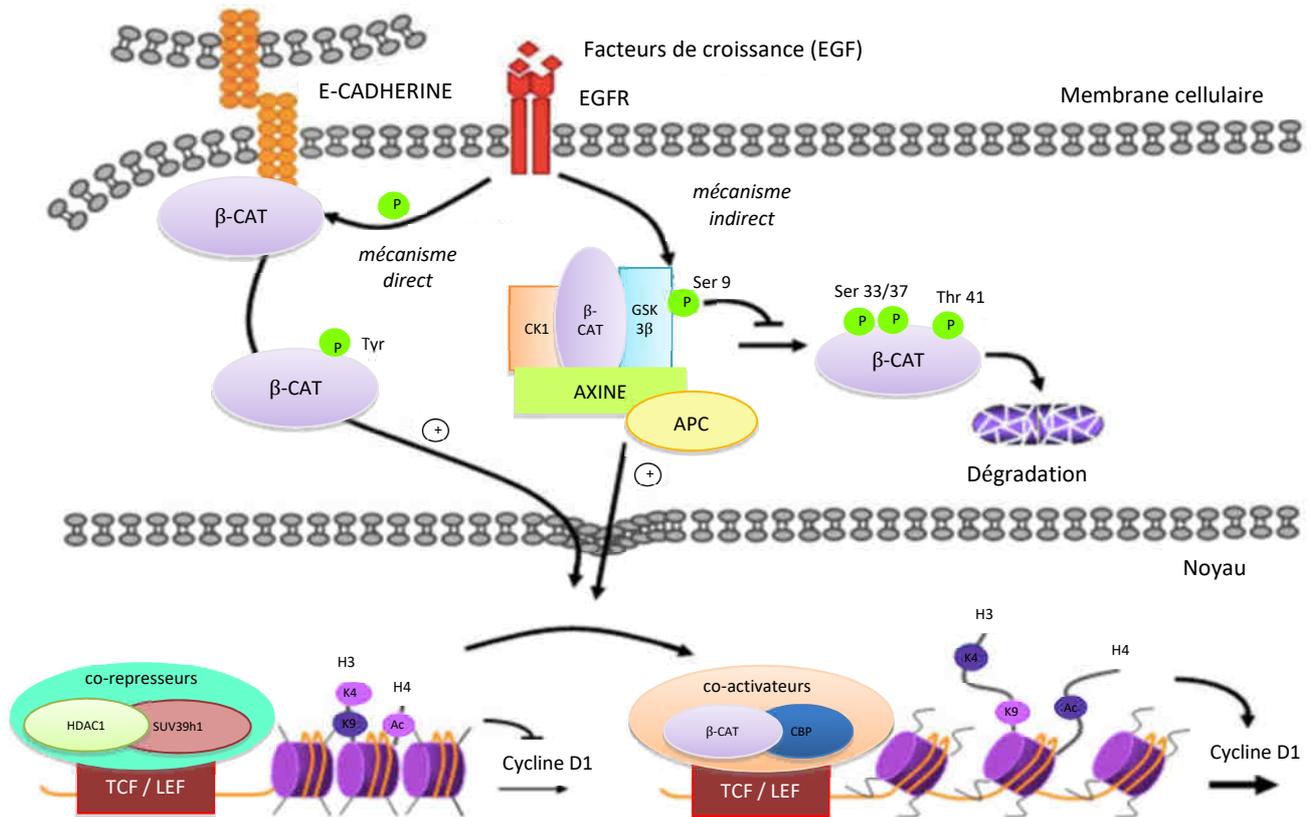


Figure 5. Effets du récepteur à l'EGF sur l'activité transcriptionnelle de la β -caténine.

L'activation de l'EGFR conduit d'une part, à la phosphorylation de la β -caténine au niveau d'une Tyrosine. Cette phosphorylation de la β -caténine entraîne sa dissociation des membranes cellulaires et ainsi son accumulation dans le cytoplasme. D'autre part, la stabilisation de la β -caténine se produit via une phosphorylation de GSK3 β au niveau de la Serine-9 par AKT. La phosphorylation de GSK3 β , entraîne une inhibition de son activité kinase, conduisant à une absence de phosphorylation des résidus Sérine 33, 37 et Thréonine 41 de la β -caténine. La β -caténine n'est plus dégradée, elle pourra alors être transloquée dans le noyau et s'associer aux facteurs de transcription TCF/LEF (D'après [Lee et al., 2010](#)).

Introduction

3.1.3 La voie WNT canonique dans l'intestin

La voie WNT canonique est très fortement activée dans la partie basale des cryptes intestinales et l'analyse de la localisation des différents acteurs de la voie WNT par hybridation *in situ* montre que cette voie présente un gradient d'activité le long de l'axe crypto-villositaire de l'intestin, avec une très forte expression de WNT et FZD dans les cryptes intestinales. Au niveau des cryptes intestinales, une forte expression des ligands WNT-3, WNT-6, WNT-9b ; et des récepteurs FZD4, FZD6 et FZD7 est détectée (Gregorieff *et al.*, 2005). La voie WNT canonique possède un rôle important dans l'épithélium intestinal et des études ont mis en évidence que l'inactivation conditionnelle de la β -caténine ou la surexpression de Dickkopf1, induit la perte des cryptes intestinales chez la souris adulte (Ireland *et al.*, 2004 ; Kuhnert *et al.*, 2004). A l'inverse, l'activation constitutive de la voie WNT induite par invalidation du gène APC entraîne une expansion du compartiment des cryptes (Andreu *et al.*, 2005). L'ensemble de ces résultats indique un rôle indispensable de la voie WNT dans l'homéostasie des cryptes intestinales.

Outre son rôle essentiel dans le maintien des cellules souches intestinales, la voie WNT contrôle également le positionnement des cellules le long de l'axe crypto-villositaire de l'intestin. En effet, la migration des cellules épithéliales le long de l'axe crypto-villositaire de l'intestin repose sur des interactions cellulaires qui font intervenir les ligands EphrinB et leurs récepteurs à activité tyrosine kinase EphB (Solanas & Batlle., 2011). Les récepteurs EphB sont des cibles transcriptionnelles de TCF4 exprimées dans les cryptes intestinales, tandis que les ligands EphrinB ont une expression réprimée par la voie WNT et sont alors exprimés au niveau des villosités intestinales (Batlle *et al.*, 2002). La perte du récepteur EphB3 conduit à un phénotype caractérisé par une délocalisation des cellules de Paneth, alors distribuées aléatoirement le long de l'axe crypto-villositaire. Les signaux WNT dans la crypte peuvent piloter séparément un programme de gènes de cellules souches / progéniteurs et un programme de maturation de cellules de Paneth (Batlle *et al.*, 2002 ; van Es *et al.*, 2005).

En contexte pathologique, l'activation constitutive de la voie WNT canonique est retrouvée dans plus de 80 % des tumeurs du côlon. Cette activation s'explique majoritairement au niveau moléculaire par l'inactivation de APC. La perte de fonction du gène suppresseur de tumeur APC résulte principalement de mutations de deux types : des mutations de type non-

Introduction

sens et des mutations liées à un décalage de la phase de lecture (« frameshifts »). Les mutations du gène *APC* sont à l'origine de la production d'une protéine APC tronquée non fonctionnelle et par conséquent d'un complexe de dégradation protéique de la β -caténine non fonctionnel. D'autres mutations ont également été décrites pour le gène *CTNNB1* qui code pour la β -caténine. Ces mutations sont souvent observées au niveau des codons qui correspondent aux sites de phosphorylation de la β -caténine en N-terminal : le produit du gène de la β -caténine muté ne peut plus être correctement phosphorylé et résiste ainsi à la dégradation. L'ensemble de ces mutations entraîne une augmentation de la stabilité et de l'activité transcriptionnelle de la β -caténine induisant l'expression de gènes impliqués dans des processus cellulaires comme la prolifération cellulaire et la progression tumorale (Sawa *et al.*, 2016).

3.2 La voie NOTCH

La voie de signalisation NOTCH, encore appelée voie d'inhibition latérale, joue un rôle clé dans la spécification des lignages sécréteur et absorbant par le biais de contacts intercellulaires mettant en jeu des ligands et des récepteurs membranaires. Elle contribue également au renouvellement des cellules souches intestinales (CBC stem cells) et favorise la prolifération des progéniteurs issus de ces cellules souches. Chez les mammifères, 4 récepteurs NOTCH (NOTCH 1 à 4) et 5 ligands NOTCH ont été identifiés.

L'interaction entre un récepteur NOTCH et un ligand NOTCH membranaire porté par une cellule voisine conduit à un changement conformationnel du récepteur à l'origine d'un double clivage : le domaine extracellulaire du récepteur NOTCH est d'abord clivé par une métalloprotéase de la famille ADAM et libéré dans le milieu extracellulaire. Le complexe γ -sécrétase, composé des protéines Préséniline, Nicastrine, APH1 et PEN2, réalise alors un deuxième clivage au niveau de la région transmembranaire du récepteur, ce qui conduit à la libération du domaine intracellulaire de NOTCH appelé NICD. Celui-ci est transloqué dans le noyau où il interagit avec le facteur de transcription RBPJ (ou CBF1) jusqu'alors associé à des répresseurs transcriptionnels tels que SMRT, CIR et SHARP (**Figure 6**).

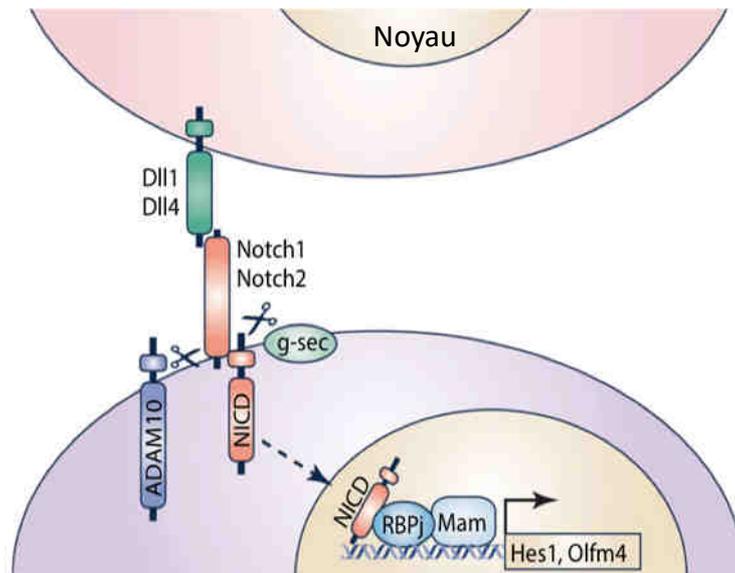


Figure 6. Représentation schématique de la voie de signalisation NOTCH.

L'activation de la voie NOTCH au sein de l'épithélium intestinal nécessite une interaction entre deux cellules voisines. L'une exprimant un ligand de NOTCH tel que DLL1, DLL4 ou JAG1 et l'autre exprimant un récepteur de type NOTCH comme NOTCH1 ou NOTCH2. Cette interaction entraîne un premier clivage du récepteur au niveau transmembranaire par une métalloprotéinase ADAM10, puis un second clivage intracellulaire par une γ -sécrétase (g-sec). Ce double clivage conduit à la libération de NICD qui va être transloqué dans le noyau où il interagit avec le facteur de transcription RBPj, appelé également CSL ou CBF1. Cette interaction permet de former un complexe d'activation de la transcription en recrutant des co-activateurs tels que Mam afin de stimuler la transcription de gènes cibles comme *Hes1*, *Olfm4* ou *Jag1* (D'après [Demitrack & Samuelson., 2016](#)).

Introduction

L'interaction de NICD avec CBF1 conduit au recrutement de co-activateurs permettant la transcription des gènes cibles de la voie NOTCH codant pour des répresseurs transcriptionnels de la famille HES ou HERP/HEY. Les facteurs HES et HEY répriment à leur tour l'expression d'activateurs transcriptionnels tels que MATH et MASH (Vooijs *et al.*, 2011). L'inhibition de l'expression de MATH1 par activation de la voie NOTCH exerce un rétrocontrôle négatif sur cette voie. L'inactivation des facteurs de transcription HES1 et MATH1, cibles directe et indirecte de la voie NOTCH, révèle que HES1 est un activateur de la prolifération des cellules des cryptes et un déterminant du lignage absorbant (Jensen *et al.*, 2000), tandis que MATH1 est un inhibiteur de la prolifération cellulaire et un déterminant du lignage sécréteur (Yang *et al.*, 2001) (Figure 6).

3.3 La voie HIPPO/YAP

La voie HIPPO/YAP est une voie très conservée chez les mammifères dont l'activation permet de contrôler la croissance des organes en régulant la prolifération et la survie cellulaire. L'activation de la voie HIPPO/YAP est entraînée par des stimuli mécaniques tels que la confluence cellulaire ou certains facteurs de croissance. Cette activation entraîne les protéines kinases MST1 et MST2, orthologues de la protéine HIPPO chez les mammifères, à phosphoryler les protéines kinases LATS1 et LATS2, ainsi que les protéines adaptatrices MOB1 et SAV1. LATS1 et LATS2 vont alors à leur tour phosphoryler les protéines YAP1 et TAZ. La phosphorylation de YAP1 et TAZ conduit à l'inactivation de ces co-activateurs transcriptionnels qui vont être transloqués dans le cytoplasme, séquestrés par les protéines 14-3-3, et éventuellement dégradés par le protéasome. A l'état non phosphorylés, YAP1 et TAZ sont capables d'interagir dans le noyau avec des facteurs de transcription comme TEAD1-4, P73, et TBX5 afin d'induire l'expression de gènes pro-prolifératifs et anti-apoptotiques tels que *CTGF*, *FGF1*, *AREG*, ou encore *BIRC5* (Pan., 2010 ; Piccolo *et al.*, 2014) (Figure 7). Au niveau de l'intestin, la localisation des protéines est telle qu'il semblerait que la voie HIPPO soit activée dans les cellules différenciées des villosités et réprimée dans les cryptes. En effet, MST1 est localisé dans le cytoplasme des cellules épithéliales des cryptes alors que l'effecteur YAP1 s'accumule dans le noyau de ces cellules. A l'inverse, dans l'épithélium des villosités, MST1 est localisé dans le noyau tandis que YAP1 est observé à l'état phosphorylé dans le cytoplasme (Barry *et al.*, 2013).

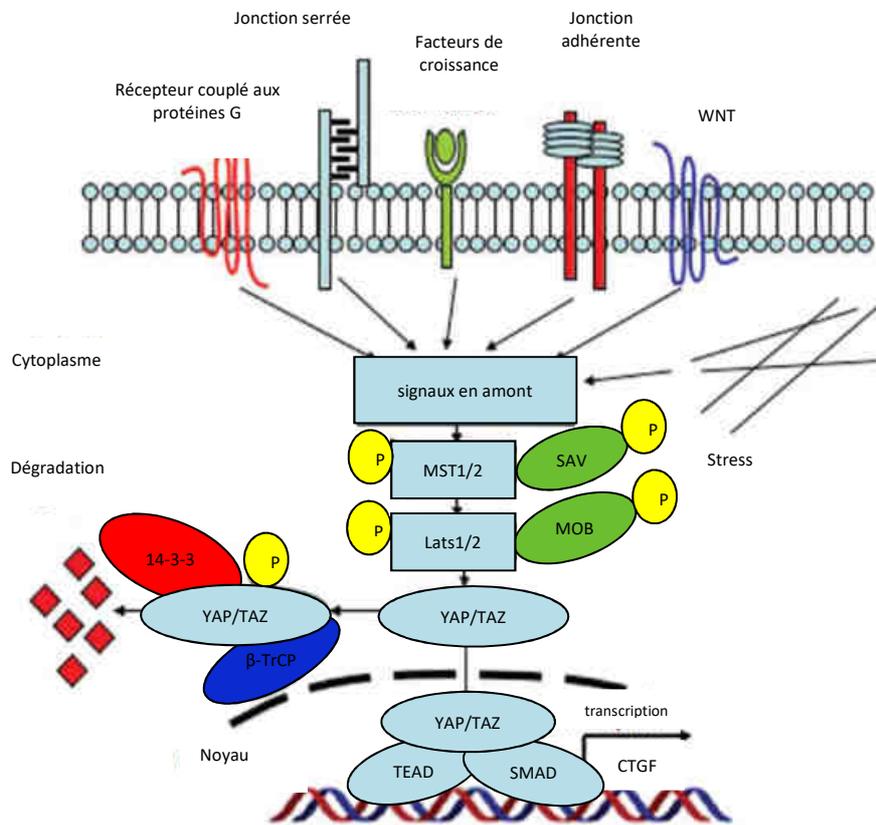


Figure 7. Représentation schématique de la voie de signalisation HIPPO/YAP.

La voie HIPPO/YAP est activée en réponse à certains stimuli comme la confluence cellulaire. Cette activation entraîne la phosphorylation des protéines MST1 et MST2, puis la phosphorylation des protéines LATS1 et LATS2. Cette phosphorylation conduit à la phosphorylation des co-activateurs YAP1 et TAZ qui sont alors réprimés et séquestrés dans le cytoplasme avant d’être éventuellement dégradés par le protéasome. Lorsque les facteurs YAP1 et TAZ ne sont pas phosphorylés, ils interagissent dans le noyau avec différents facteurs de transcription induisant l’expression de gènes impliqués dans la prolifération et la survie cellulaire (D’après Guo & Teng., 2015).

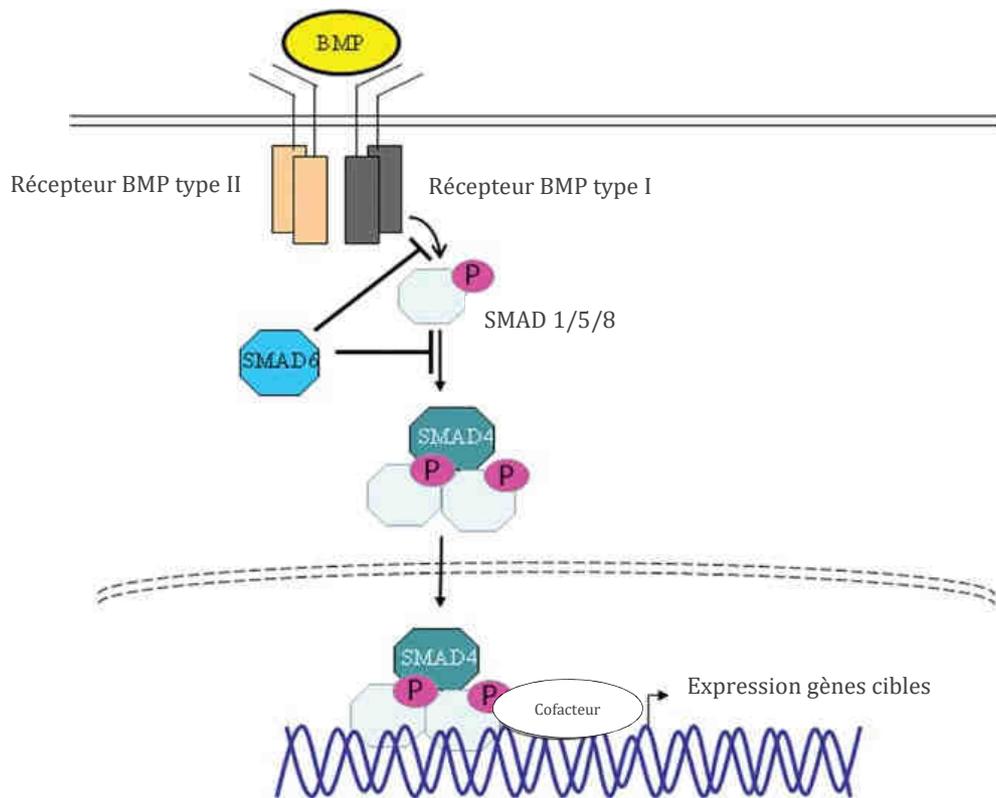


Figure 8. Représentation schématique de la voie de signalisation BMP.

La liaison d'un facteur BMP à son récepteur tétramérique entraîne la phosphorylation et l'activation des protéines SMAD1, 5, ou 8 qui s'associent alors avec SMAD 4 et entraînent l'activation de gènes cibles dans le noyau. Plusieurs facteurs régulent négativement la voie BMP tels que NOGGIN ou les protéines SMAD6 et 7 (D'après [Tan et al., 2012](#)).

Introduction

3.4 La voie BMP

La voie BMP favorise la différenciation des cellules progénitrices et empêche la prolifération des cellules différenciées des villosités. Les mécanismes par lesquels la voie BMP exerce son effet anti-prolifératif reposent en partie sur la stabilisation de l'inhibiteur de CDK P21^{Waf1} (Beck *et al.*, 2007). Les protéines BMPs produites par les cellules du stroma, sont des facteurs de croissance appartenant à la famille du TGFβ qui se lient sous la forme d'homodimères ou d'hétérodimères à un récepteur tétramérique à activité Serine/Thréonine kinase. Au fond des cryptes, les BMPs sont bloqués de manière spécifique par une liaison à NOGGIN, les empêchant d'activer les récepteurs BMP à la surface cellulaire. La voie BMP est activée à mi-crypte par la liaison des BMPs aux récepteurs. Ceci induit la phosphorylation du récepteur de type 1 par le récepteur de type 2, qui phosphoryle à son tour les protéines cytoplasmiques SMAD1, 5 ou 8. Celles-ci forment alors des complexes dimériques actifs avec SMAD4. Les complexes SMAD sont transloqués dans le noyau où ils vont interagir avec des co-activateurs ou des co-répresseurs transcriptionnels pour réguler l'expression des gènes cibles de la voie BMP, tels que SMAD6 et 7, NOGGIN, JUNB et ID1, 3 (Bragdon *et al.*, 2011 ; Miyazono *et al.*, 2005 ; Zwijsen *et al.*, 2003). Plusieurs facteurs, tels que NOGGIN ou les protéines SMAD6 et 7 régulent négativement la voie BMP (Wang *et al.*, 2014). La voie de signalisation du TGFβ est également dépendante de la voie des MAPK (Javelaud & Mauviel., 2005 ; Medema & Vermeulen., 2011) (**Figure 8**).

3.5 La voie HEDGEHOG

La voie HEDGEHOG dans l'intestin est essentielle au maintien de la structure cryptovillositaire de l'épithélium intestinal en stimulant la prolifération et la maturation des cellules stromales qui produisent en retour les facteurs nécessaires au maintien de la niche des cellules souches tels que les facteurs BMP (Sato *et al.*, 2011).

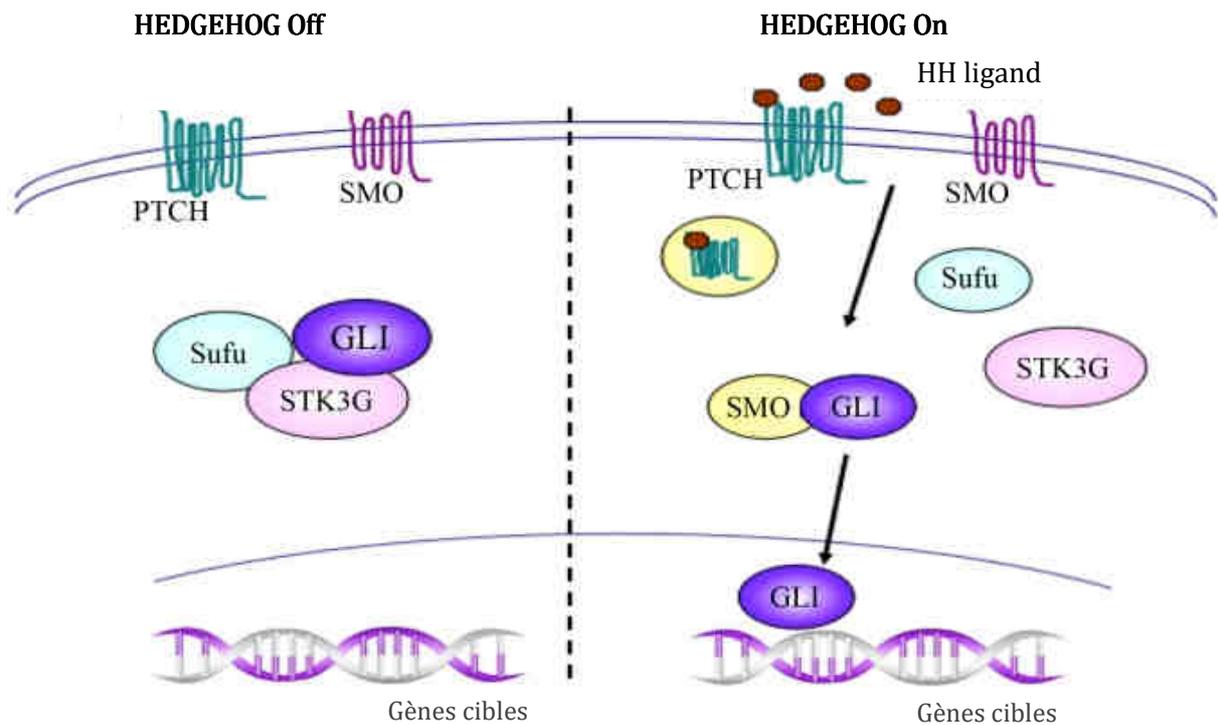


Figure 9. Représentation schématique de la voie de signalisation HEDGEHOG.

En absence de ligand HH, le récepteur PTCH inhibe l'activité de la protéine SMO, entraînant ainsi une phosphorylation des facteurs de transcription GLI qui agiront comme des répresseurs transcriptionnels. En revanche, la liaison de HH sur le récepteur PTCH conduit à une inhibition de ce dernier, entraînant une activation de SMO. Il en résulte une translocation nucléaire des facteurs GLI activés permettant l'expression des gènes cibles de la voie (D'après [Ding & Wang, 2017](#)).

Introduction

Les ligands Hedgehog (HH) sont spécifiquement exprimés au niveau de l'épithélium intestinal, tandis que les récepteurs PTCH et les effecteurs GLI sont exprimés par les cellules mésenchymateuses (Madison *et al.*, 2005). En absence de ligand HH, les récepteurs PTCH inhibent l'activité du récepteur SMO conduisant à la phosphorylation cytoplasmique des facteurs de transcription de la famille GLI par les protéines kinases PKA, GSK3 β et CK1. Une fois phosphorylés, les facteurs GLI2 et GLI3 sont des cibles de l'E3 Ubiquitine ligase β -TrCP, entraînant leur dégradation partielle par le protéasome et la génération de formes tronquées qui fonctionnent comme des répresseurs transcriptionnels inhibant l'expression des gènes cibles de la voie HEDGEHOG. A l'inverse, l'interaction d'un ligand HH avec un récepteur PTCH conduit à la phosphorylation et à l'activation du récepteur SMO par les protéines kinases GRK2 et CK1 α . L'activation de SMO empêche alors la phosphorylation et le clivage de GLI2 et GLI3. Les formes intactes de ces protéines fonctionnent comme des activateurs transcriptionnels et stimulent la transcription de leurs gènes cibles, tels que *BMP*, *BCL-2*, *CYCLINE D* et *MYC* (van Den Brinck., 2007 ; Chen & Jiang., 2013) (Figure 9).

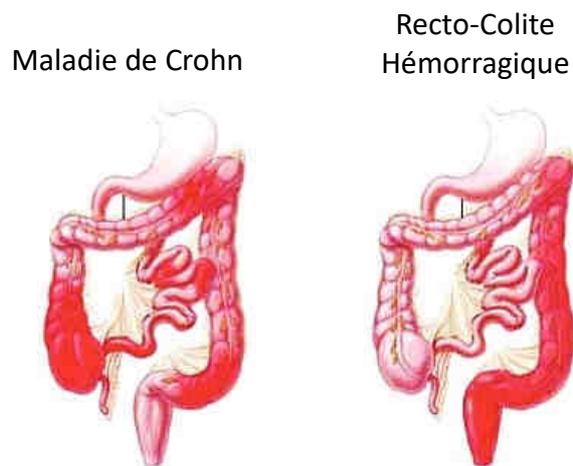


Figure 10. Localisation des lésions inflammatoires dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin : maladie de Crohn vs rectocolite hémorragique.

Le processus inflammatoire s'accompagne de lésions qui peuvent toucher de manière simultanée ou successive, un ou plusieurs segments du tube digestif. Dans la maladie de Crohn, l'atteinte de la muqueuse est en mosaïque et peut toucher toutes les parties du tube digestif. L'atteinte de la muqueuse dans la rectocolite hémorragique est continue et touche toujours le rectum, mais peut s'étendre jusqu'au côlon (D'après <http://www.chirurgiecolorectale.fr>).

Introduction

II- Les pathologies intestinales

L'altération des mécanismes régulant l'homéostasie intestinale est à l'origine, ou accompagne, les pathologies intestinales majeures que sont les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin et les cancers colorectaux.

1. Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

1.1 Généralités

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) touchent environ 250 000 personnes en France et l'incidence est de 8 000 nouveaux cas par an ([Association Français Aupetit](#)). Les MICI touchent aussi bien les hommes que les femmes et se caractérisent notamment par une atteinte inflammatoire sévère du tractus gastro-intestinal. Il s'agit de pathologies chroniques évoluant par période de poussées où le patient présente majoritairement des douleurs abdominales et de la diarrhée, qui vont être entrecoupées par des périodes plus ou moins longues de rémission sans symptômes. Les MICI regroupent deux pathologies principales que sont la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique qui vont différer selon plusieurs aspects ([Abraham & Cho., 2009](#)). En effet, si l'âge de diagnostic de la pathologie est variable, celui-ci va préférentiellement être entre 20 et 30 ans pour la maladie de Crohn et entre 30 et 40 ans pour la rectocolite hémorragique ([Cosnes *et al.*, 2011](#)). De plus, les atteintes du tractus digestif ne sont pas tout à fait les mêmes entre les deux maladies. Dans la maladie de Crohn, l'inflammation peut toucher l'ensemble du tractus digestif, avec une atteinte fréquente de l'intestin grêle, une atteinte périnéale dans 30 % des cas et des atteintes extra-digestives chez environ 50 % des patients; les plus fréquentes étant articulaires, ophtalmologiques et cutanées ([Torres *et al.*, 2017](#)). Dans la rectocolite hémorragique, l'atteinte inflammatoire est limitée au rectum et au côlon ([Ungaro *et al.*, 2017](#)) (**Figure 10**). La sévérité et l'étendue de l'inflammation, ainsi que la réponse aux traitements qui ne sont à l'heure actuelle pas curatifs, vont déterminer la qualité de vie des patients et la survenue de complications. Ainsi, l'inflammation chronique constituant un

Introduction

facteur carcinogène, il est à présent bien établi que les patients souffrant de MICI colique présentent un risque 2 à 3 fois plus élevé de développer un cancer colorectal par rapport à la population générale (Viennot *et al.*, 2009). D'autres complications graves, notamment des sténoses, abcès, fistules ou colites aiguës graves, peuvent également survenir.

1.2 La physiopathologie des MICI

La physiopathologie des MICI présente un caractère multifactoriel et n'est actuellement pas encore complètement comprise. Ainsi, des facteurs génétiques, environnementaux, immunologiques semblent être impliqués dans le développement de ces pathologies intestinales.

1.2.1 Les facteurs génétiques

Les études familiales, en particulier chez les jumeaux, ont suggéré l'implication de facteurs génétiques et mis en évidence l'existence de formes familiales. L'ensemble des données obtenues souligne l'importance du fond génétique dans le développement des MICI. Plusieurs études ont permis d'identifier une centaine de gènes (plus de 160) impliqués dans le développement des MICI. L'association génétique la plus clairement établie est celle de la mutation du gène *NOD2* qui est retrouvée chez environ 50 % des patients atteints de la maladie de Crohn (Hugot *et al.*, 2001). Cependant, les données épidémiologiques et la concordance imparfaite entre les jumeaux monozygotes montrent que les facteurs génétiques ne sont pas les seuls responsables du développement des MICI (Spehlmann *et al.*, 2008).

1.2.2 Les facteurs environnementaux

L'augmentation rapide de l'incidence des MICI dans les pays en voie d'émergence et l'augmentation des risques dans les populations migrantes suggèrent l'implication de divers

Introduction

facteurs environnementaux (Pinsk *et al.*, 2007). De nombreux facteurs environnementaux pourraient jouer un rôle dans le développement et l'évolution des MICI, tels que : le tabac, le stress, l'alimentation, le mode de vie, la pollution ou encore l'appendicectomie. Néanmoins, à l'heure actuelle, seuls le tabac et l'appendicectomie ont été établis comme impliqués dans les MICI (Carbonnel *et al.*, 2009).

L'effet du tabac sur l'apparition et l'évolution de la maladie n'est pas le même pour la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique. En effet, le tabagisme va augmenter le risque d'apparition de la maladie de Crohn et va aggraver son évolution. A l'inverse, dans le cas de la rectocolite hémorragique, le tabagisme va diminuer les risques de survenue de la maladie, va ralentir sa progression et limiter la sévérité de l'atteinte colique (Calkins *et al.*, 1989 ; Cosnes *et al.*, 2001 ; Odes *et al.*, 2001). La relation entre le tabac et les MICI est donc clairement établie, mais si le tabac semble être un facteur modulant l'inflammation, il ne peut pas à lui seul être responsable du développement des MICI.

L'appendicectomie est le second facteur environnemental établi dans le développement des MICI. Plusieurs études ont montré qu'un antécédent d'appendicectomie a un effet protecteur vis à vis de la rectocolite hémorragique, en réduisant de 70 % son risque de développement. Cet effet protecteur n'est observé que chez les patients ayant subi une véritable appendicite et ayant été opérés avant l'âge de 20 ans (Andersson *et al.*, 2001).

1.2.3 Les facteurs immunologiques

Si la pathogénie des MICI n'est pas clairement établie, il semble évident qu'en plus des facteurs génétiques et environnementaux, il y ait une activation inappropriée du système immunitaire envers la flore intestinale. Il existe un lien étroit entre le système immunitaire, le microbiote intestinal et l'intégrité de la barrière intestinale (Xavier & Podolsky., 2007).

Le microbiote intestinal correspond à l'ensemble des microorganismes présent dans le tractus gastro-intestinal et il existe une véritable coopération entre le microbiote intestinal et l'hôte qui l'héberge, conduisant pour chacun à des avantages certains. Le microbiote intestinal est nécessaire dans la fermentation des substrats au niveau du côlon, dans le

Introduction

développement du système immunitaire intestinal et joue également un rôle important de barrière empêchant la colonisation de l'intestin par des bactéries pathogènes (Marchesi & Shanahan., 2007 ; Tremaroli & Bäckhed., 2012). Dans le cadre des MICI, plusieurs études ont mis en évidence un déséquilibre du microbiote, connu sous le nom de dysbiose (Huttenhower *et al.*, 2014). En effet, les patients atteints de MICI présentent une dysbiose associée à une diminution de la biodiversité du microbiote intestinal et à une concentration bactérienne plus élevée au niveau des lésions de la muqueuse (Walker *et al.*, 2011). Chez les personnes saines, la barrière intestinale, constituée de différents éléments tels que la flore intestinale, le mucus, les cellules immunitaires et les cellules épithéliales, permet d'éviter l'entrée de ces pathogènes. Les cellules épithéliales intestinales qui communiquent en permanence avec la flore intestinale et les éléments de la lumière intestinale, sont capables de reconnaître ces pathogènes via des récepteurs extracellulaires aux peptides bactériens (TLRs) et via leurs récepteurs intracellulaires tels que NOD2 (McGuckin *et al.*, 2009). Mais, des défauts au niveau de la barrière intestinale ont été rapportés chez les patients atteints de MICI. Il s'agit notamment d'un défaut dans la production de peptides antimicrobiens, d'une réduction de la sécrétion de mucus, d'une augmentation de la perméabilité de la muqueuse par déstabilisation des jonctions cellulaires. L'ensemble de ces perturbations conduit à la rupture de l'homéostasie intestinale par augmentation des contacts entre les bactéries et les cellules du système immunitaire, menant ainsi au développement d'une MICI (Brown *et al.*, 2012). De plus, outre le déséquilibre du microbiote et les altérations de la barrière intestinale, les patients atteints de MICI peuvent également présenter une altération des mécanismes de reconnaissance des composants bactériens tels que les TLRs, empêchant l'initiation d'une réponse immunitaire adaptée et entraînant une infiltration excessive de la muqueuse intestinale par diverses cellules de l'immunité innée et adaptative (Baumgart & Carding., 2007).

Introduction

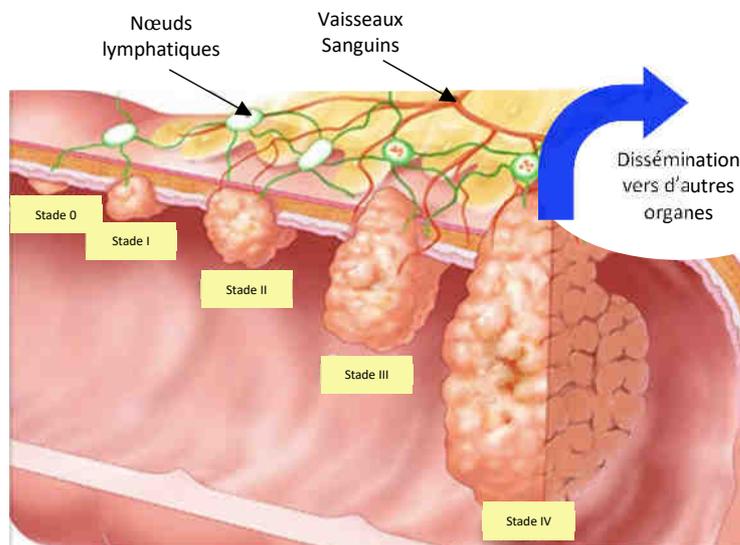
2. Les cancers colorectaux

2.1 Epidémiologie et classification anatomopathologique

2.1.1 Epidémiologie et facteurs de risques

Le cancer colorectal (CCR) est une pathologie grave et fréquente qui regroupe les cancers du côlon (2/3 des cas) et les cancers du rectum. Avec plus de 44 500 nouveaux cas en 2017, le CCR est en France le 2^{ème} cancer chez la femme après le cancer du sein et le 3^{ème} chez l'homme après la prostate et le poumon. En France, le CCR est la 2^{ème} cause de décès par cancer après le cancer du poumon et est responsable de plus de 18 000 décès par an (Inca). D'ici 2030, dans le monde, le nombre de nouveaux cas et de décès imputables au CCR devrait augmenter d'environ 60 % (Arnold *et al.*, 2016). Des variations géographiques de l'incidence des CCR ont été observées et la prévalence de la maladie semble être plus importante dans les pays développés que dans les pays en voie de développement (International Agency For Research on Cancer., 2014). La gravité des CCR est liée au stade de la maladie et à sa propension à former des métastases principalement hépatiques et pulmonaires (Hollande *et al.*, 2010).

Les études épidémiologiques suggèrent que différents facteurs influencent le risque de développement du CCR, parmi lesquels l'âge joue un rôle important puisque 90 % des patients diagnostiqués ont plus de 50 ans (Hagggar & Boushey., 2009). Le mode de vie constitue également un facteur important : ainsi, la consommation d'alcool et/ou de tabac, un régime alimentaire riche en viandes rouges, la sédentarité, l'obésité et le diabète augmentent le risque de développement de CCR de 20 à 60 % (Huxley *et al.*, 2009 ; Lecomte *et al.*, 2019). La majorité des CCR (75 %) sont d'origine sporadique, mais les antécédents familiaux peuvent influencer et environ 25 % des CCR sont d'origine héréditaire (Lynch & de la Chapelle., 2003). Ainsi, les personnes dont un membre de la famille du premier degré a développé un CCR ont 2 à 3 fois plus de risques de développer la maladie (Butterworth *et al.*, 2006). Enfin, comme mentionné dans le chapitre précédent, les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin augmentent de 2 à 3 fois le risque de développer un CCR (Viennot *et al.*, 2009).



Stade	TNM	Caractéristiques
0	Tis N0 M0	Tumeur restreinte à la muqueuse (tumeur <i>in situ</i>)
I	T1-T2 N0 M0	Atteinte de la sous-muqueuse ou de la musculuse
II	T3-T4 N0 M0	Atteinte de la séreuse ou des organes avoisinants
III	T1-T4 N1-N2 M0	Envahissement ganglionnaire
IV	T1-T4 N0-N2 M1	Métastase(s) à distance

Figure 11. Représentation schématique et critères d'évaluation des différents stades tumoraux.

Les différents stades tumoraux sont définis selon un système de classification international standardisé qui rend compte de l'extension locale (T), ganglionnaire (N) et métastatique (M). Chaque stade est défini selon des critères histologiques précis et selon l'envahissement tumoral. Le taux de survie du cancer colorectal est relativement élevé aux stades précoces (I et II), mais diminue très fortement aux stades tardifs (III-IV) (D'après Winslow, U.S. Govt., 2005).

Introduction

2.1.2 Classification histologique

Les systèmes de classification des tumeurs colorectales actuellement proposés permettent d'établir un pronostic de la tumeur et/ou de déterminer le protocole thérapeutique le plus adapté au patient. Cette classification histologique des tumeurs tient compte de plusieurs éléments tels que le stade tumoral et/ou le grade tumoral.

2.1.2.1 Le stade tumoral

Le stade tumoral est déterminé selon la classification TNM qui est un système de classification international standardisé rendant compte de l'extension locale (T), ganglionnaire (N), et métastatique (M) de la tumeur (Markowitz *et al.*, 2002). Ces trois paramètres sont suivis d'un chiffre, ou de la lettre X lorsque l'évaluation est impossible. Ainsi, la profondeur de la tumeur primitive (T) est cotée de 1 (tumeur très localisée) à 4 (envahissement des organes du voisinage); l'envahissement ganglionnaire (N) est évalué de 0 (absence de métastases ganglionnaires) à 2 (un grand nombre de ganglions sont envahis); et l'existence de métastases (M) est cotée de 0 (absence de métastases) à 1 (formation de métastases à distance de la tumeur primitive) (**Figure 11**).

2.1.2.2 Le grade tumoral

Le grade tumoral est un indicateur du degré de différenciation de la tumeur. Quatre grades de différenciation tumorale sont classiquement décrits : les tumeurs colorectales de bas grade (G1) correspondent à des tumeurs bien différenciées dans lesquelles les zones glandulaires sont conservées, alors que les tumeurs de haut grade sont peu différenciées (G3) voire indifférenciées (G4). Tout comme le stade tumoral, le grade de différenciation tumorale est un facteur pronostic, les tumeurs de bas grade étant associées à un meilleur pronostic que les tumeurs de haut grade (Derwinger *et al.*, 2010).

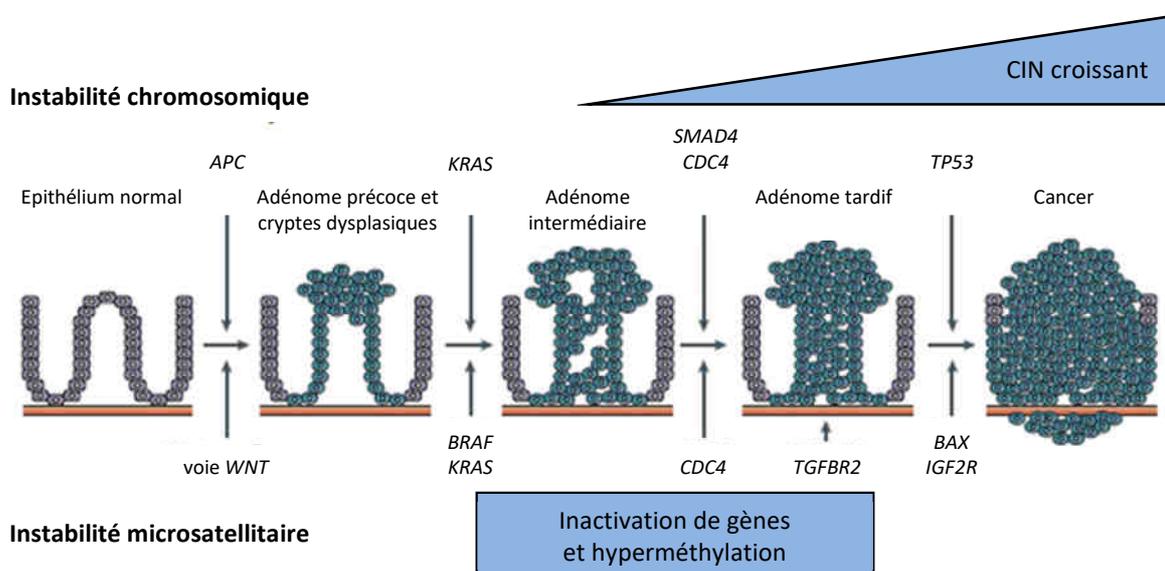


Figure 12. Développement d'un adénocarcinome colique selon le modèle de Fearon et Vogelstein.

Selon ce modèle, la progression tumorale est vue comme une succession d'activations d'oncogènes ou d'inactivations de gènes suppresseurs de tumeurs permettant la transformation d'un épithélium normal en carcinome. L'événement initiateur de la formation d'un adénome est la perte du gène *APC*, suivie d'une série de mutations/délétions affectant les gènes *KRAS*, *SMAD4* et *TP53*, conduisant à la carcinogenèse. L'instabilité chromosomique augmente au cours de la progression tumorale et peut être accompagnée d'une instabilité microsatellitaire, ainsi que de l'hyperméthylation de certains gènes. A noter que ce modèle est remis en cause par la notion d'hétérogénéité tumorale (D'après [Walther et al., 2009](#)).

Introduction

2.2. Altérations chromosomiques dans les CCR

Les CCR humains présentent une instabilité génomique mettant en jeu trois mécanismes moléculaires non exclusifs : l'instabilité chromosomique (CIN), l'instabilité microsatellitaire (MSI) et l'instabilité épigénétique (CIMP).

2.2.1 Les CCR de type CIN

L'instabilité chromosomique (CIN) est la forme d'instabilité génétique la plus fréquemment retrouvée dans les CCR et les cancers de type CIN représentent ainsi 65 à 70 % de l'ensemble des CCR. Ils sont caractérisés par la perte ou l'amplification de régions chromosomiques conduisant à une aneuploidie et à des pertes d'hétérozygotie (Lengauer *et al.*, 1998). Ces pertes alléliques affectent en particulier les gènes *APC*, *TP53* et *SMAD4* et sont par ailleurs associées à des mutations génétiques ponctuelles (Markowitz & Bertagnolli., 2009). Depuis les années 1990, la progression tumorale des CCR est vue comme une accumulation de mutations génétiques séquentielles (Fearon & Vogelstein., 1990). Ainsi, la perte de fonction du gène suppresseur de tumeur *APC* est un événement précoce de la tumorigenèse. Celle-ci conduit à l'activation constitutive de la voie WNT, à l'origine du développement de cryptes aberrantes au niveau de l'épithélium colique. La mutation ponctuelle de l'oncogène *KRAS* intervient à un stade intermédiaire du développement tumoral, lors de la transition adénome précoce - adénome intermédiaire, tandis que les mutations des gènes suppresseurs de tumeurs *SMAD2/4* et *TP53* surviennent à des stades plus tardifs (Figure 12). Néanmoins, ce modèle est partiellement remis en cause ces dernières années par la notion d'hétérogénéité cellulaire et moléculaire entre les tumeurs de différents patients, mais également au sein d'une même tumeur (Thiery., 2002 ; Jass *et al.*, 2003).

2.2.1.1 Formes sporadiques

Dans environ 80 % des cas de CCR sporadiques de phénotype CIN, des mutations somatiques du gène *APC* sont détectées et sont à l'origine de la production d'une protéine APC tronquée

Introduction

non fonctionnelle (Miyoshi *et al.*, 1992 ; Ponz de Leon *et al.*, 2001). En outre, il peut se produire une perte d'expression du gène *APC* puisqu'une hyperméthylation de son promoteur a été décrite dans environ 18 % des cas de CCR (Esteller *et al.*, 2000). Il existe également des mutations activatrices de la β -caténine, dans la moitié des CCR sporadiques de type CIN dans lesquels *APC* n'est pas muté (Sparks *et al.*, 1998). Les mutations du gène codant la β -caténine se produisent au niveau des sites de phosphorylation de la β -caténine, ce qui conduit à la production d'une protéine ne pouvant pas être correctement phosphorylée et dégradée (Sawa *et al.*, 2016). De plus, des gènes impliqués dans la voie MAPK sont également fréquemment mutés dans les CCR. C'est le cas du gène *KRAS* qui est muté dans environ 40 % des CCR de type CIN (Yashiro *et al.*, 2001). Les protéines de la voie PI3K/AKT sont également mutées dans les CCR. Le gène codant pour la sous-unité p110 α de AKT est muté dans 10-20 % des CCR, tandis que l'inactivation du gène suppresseur de tumeur *PTEN* est retrouvée dans 6 % des CCR (Cathomas., 2014 ; Parsons *et al.*, 2005).

2.2.1.2 Formes héréditaires

La polypose adénomateuse familiale (PAF) représente moins de 1 % des cas de CCR (Half *et al.*, 2009). Ce syndrome résulte de mutations germinales du gène *APC*, dont la très grande majorité correspond à des mutations non-sens ou à un décalage de la phase de lecture (« frameshift »), à l'origine de la production d'une protéine *APC* tronquée non fonctionnelle. Il s'agit d'une maladie génétique dont les familles atteintes vont se transmettre un allèle muté du gène suppresseur de tumeur *APC*. Ainsi, la mutation somatique du deuxième allèle *APC* va conduire au développement de centaines de polypes dont le risque d'évolution maligne avant 40 ans est quasi certain. Ce phénotype s'accompagne parfois du développement de tumeurs dans d'autres organes digestifs, tels que l'estomac, l'intestin grêle ou le pancréas, et de tumeurs extra-digestives (thyroïde, système nerveux) (Fearon., 2011).

Introduction

2.2.2 Les CCR de type MSI

Les cancers possédant une instabilité microsatellitaire (MSI) sont associés à un meilleur pronostic, se développent préférentiellement au niveau du côlon proximal, et sont souvent de type mucineux (Boland & Goel., 2010). Les CCR de type MSI résultent de mutations dans les gènes du système de réparation MMR des mésappariements et des insertions/délétions de bases de l'ADN. Chez les mammifères, le système MMR est constitué de 5 protéines MSH (MSH2 à MSH6) et de 4 protéines MLH (MLH1, MLH3, PMS1, PMS2). La survenue de mutations dans l'un de ces gènes conduit à une instabilité des séquences microsatellites, de petites séquences d'ADN répétées et dispersées dans le génome qui, du fait de leur nature, sont fréquemment affectées par les erreurs de réplication de l'ADN (Bedeir & Krasinskas., 2011). L'instabilité microsatellitaire est définie comme un changement de la longueur d'une séquence d'ADN microsatellite consécutivement à des événements d'insertion ou de délétion de nucléotides, lesquelles sont à l'origine de l'apparition de mutations non-sens ou de décalage du cadre de lecture (« frameshift ») conduisant souvent à l'apparition d'une protéine tronquée (Boland & Goel., 2010). Les tumeurs colorectales de type MSI présentent ainsi fréquemment des mutations microsatelitaires dans les gènes *BRAF*, *BAX*, ou encore *TGF β R2* (Jung *et al.*, 2007).

2.2.2.1 Formes sporadiques

Les CCR sporadiques de type MSI représentent environ 12 % de l'ensemble des CCR et sont associés à une hyperméthylation du promoteur du gène *MLH1* dans les cellules somatiques, conduisant à la perte d'expression du gène (Boland & Goel., 2010 ; Kane *et al.*, 1997). Dans 40 à 50 % des cas, l'hyperméthylation du promoteur *MLH1* est associée à la mutation de l'oncogène *BRAF* entraînant l'activation constitutive de la protéine kinase BRAF impliquée dans la croissance tumorale (Geiersbach & Samowitz., 2011).

Introduction

2.2.2.2 Formes héréditaires

Le syndrome de Lynch, également appelé syndrome HNPCC, correspond à environ 3 % des CCR. Il s'agit d'une maladie génétique caractérisée par le développement précoce (avant 50 ans) de tumeurs principalement au niveau du côlon proximal et dans d'autres organes tels que l'estomac, l'intestin grêle, l'ovaire, l'endomètre, et les voies biliaires (Geiersbach & Samowitz., 2011 ; Vasen *et al.*, 1999). Les tumeurs coliques et extra-coliques qui se développent dans le cadre de ce syndrome sont caractérisées par une forte instabilité microsatellitaire associée à la présence d'une mutation bi-allélique dans les gènes *MSH2*, *MLH1*, *PMS2* ou *MSH6*. La contribution relative de chacun de ces gènes au développement d'un syndrome de Lynch est de 38 %, 32 %, 15 % et 14 %, respectivement (Palomaki *et al.*, 2009).

2.2.3 Les CCR de type CIMP

En marge de l'instabilité chromosomique et microsatellitaire, environ 20 à 30 % des CCR présentent une instabilité épigénétique. Ce phénotype, appelé CIMP, a été décrit pour la première fois en 1999. Les CIMP résultent d'une hyperméthylation des îlots CpG de l'ADN (Toyota *et al.*, 1999). Les îlots CpG correspondent à des dinucléotides CG, dont la méthylation participe à la répression de l'expression génique et sont retrouvés dans près de 50 % des régions promotrices du génome humain. Dans les CCR de type CIMP, l'hyperméthylation des îlots CpG conduit à la perte d'expression de nombreux gènes, parmi lesquels les gènes suppresseurs de tumeurs *P16INK4A* et *CDH1*, et les gènes impliqués dans la réparation de l'ADN *MGMT* et *MLH1* (Lao & Grady., 2011). Ainsi, le phénotype CIMP est fortement associé aux CCR sporadiques de type MSI présentant une hyperméthylation du promoteur du gène *MLH1* et des mutations du gène *BRAF*.

De plus, 30 à 90 % des CCR présentent une expression augmentée de l'EGFR. Cette augmentation de l'expression de l'EGFR dans les CCR, n'est pas liée à une amplification du gène, ni à des mutations du domaine kinase contrairement aux cancers du poumon. Cette surexpression de l'EGFR pourrait donc être expliquée par les nombreuses modifications

Introduction

épigénétiques comme des méthylations de l'ADN qui se produisent dans les CCR (Radinsky *et al.*, 1995 ; Sauer *et al.*, 2005).

2.2.4 Les autres formes héréditaires de CCR

Bien que les syndromes de PAF et de Lynch soient les formes héréditaires de CCR les plus représentées, d'autres syndromes héréditaires associés à un risque élevé de CCR ont été décrits.

La polypose adénomateuse multiple associée au gène *MUTYH* (MAP) est une polypose adénomateuse à transmission autosomique récessive résultant de mutations bi-alléliques du gène *MUTYH*, impliqué dans le système de réparation BER de l'ADN (Al-Tassan *et al.*, 2002). Le syndrome MAP est comme le syndrome de PAF caractérisé par l'émergence d'un nombre variable de polypes adénomateux au niveau du côlon et du rectum, associés à un risque accru de développement de CCR (Balaguer *et al.*, 2007).

Le syndrome de Peutz-Jeghers est une polypose hamartomateuse rare affectant en moyenne 1 personne sur 150 000. Ce syndrome est caractérisé par une hyperpigmentation muco-cutanée caractéristique et par l'émergence de polypes hamartomateux majoritairement localisés au niveau de l'intestin grêle. Ce phénotype est associé à un risque accru de développer un cancer gastro-intestinal ou gynécologique (van Lier *et al.*, 2010). Des mutations germinales du gène suppresseur de tumeur *STK11/LKB1* sont impliquées dans l'émergence de la maladie et sont transmises selon un déterminisme autosomique dominant (Jenne *et al.*, 1998).

La polypose juvénile est une affection rare à transmission autosomique dominante dont l'incidence est proche de celle du syndrome de Peutz-Jeghers (Schreibman *et al.*, 2005). Dès l'enfance, les patients développent des polypes hamartomateux gastro-intestinaux préférentiellement localisés dans le côlon et le rectum, lesquels sont associés à un risque de

Introduction

développement de CCR de 40 % (Brosens *et al.*, 2007). Les mutations causales affectent en particulier le gène *SMAD4*, impliqué dans la voie de signalisation BMP (Howe *et al.*, 1998 & 2001).

2.3. Traitements des cancers colorectaux

2.3.1 La chirurgie

La résection chirurgicale est à l'heure actuelle le seul traitement permettant la guérison du CCR. Elle est utilisée pour permettre une résection tumorale complète, c'est à dire pour extraire la tumeur primaire ainsi que les tissus et les ganglions lymphatiques environnants affectés. Selon la localisation et le stade de la tumeur, l'acte chirurgical ne sera pas le même. En effet, il peut aller de l'exérèse locale pour les stades les plus précoces, à la résection totale ou partielle de différentes sections de l'intestin, jusqu'à la chirurgie des zones métastasées, notamment le foie et les poumons (Althumairi & Gearhart., 2015). Aux stades les plus précoces de la maladie, la résection chirurgicale peut être envisagée seule sans traitement additionnel. Après exérèse complète, le risque de récives locales et/ou de métastases dépend de la localisation et du stade de la tumeur primitive. Il est de 10 % pour les stades I, de 15 à 30 % pour les stades II et de 20 à 60 % pour les stades III.

2.3.2 La chimiothérapie

La chimiothérapie est utilisée dans le traitement des CCR des stades II à IV de la maladie. Elle peut être administrée en pré-opératoire afin de réduire la taille de la tumeur pour faciliter ou rendre possible la résection chirurgicale. Elle peut également être administrée en post-opératoire, notamment chez des patients possédant des risques élevés de récives locales et/ou de métastases. La chimiothérapie principalement utilisée dans les CCR est le 5-Fluorouracil associé à l'acide folinique ou leuovorin qui en potentialise les effets (Morgan., 1989), et en combinaison avec d'autres molécules cytotoxiques telles que l'oxaliplatine (combinaison FOLFOX) ou l'irinotécan (combinaison FOLFORI). Les combinaisons FOLFOX et

Introduction

FOLFIRI semblent avoir une efficacité équivalente sur les CCR (Sobrero & Bennicelli, 2010), et le choix entre les deux combinaisons peut se faire en fonction des effets secondaires attendus. Les doses administrées ainsi que le rythme des cures varient en fonction des patients, du stade de la maladie et de la tolérance au traitement.

2.3.3 Les thérapies ciblées

Pour les cancers métastatiques, les chimiothérapies conventionnelles peuvent être associées à des thérapies ciblées. Il s'agit notamment du cétuximab qui est un anticorps monoclonal ciblant et bloquant l'EGFR surexprimé à la surface de certaines cellules tumorales. L'utilisation du cétuximab est conditionnée par l'existence ou non de mutations notamment au niveau du gène *KRAS*. Cette mutation doit être recherchée préalablement puisqu'elle confère une résistance aux thérapies de type anti-EGFR (Phelip *et al.*, 2019). Un autre anticorps monoclonal peut être utilisé dans le traitement des CCR, le bévécizumab. Il est dirigé contre le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) et inhibe ainsi l'angiogenèse (Ciombor *et al.*, 2015). Enfin, pour les patients atteints d'un CCR métastatique, en échec thérapeutique, le régorafénib qui est un inhibiteur des protéines tyrosines kinases impliquées dans les phénomènes d'angiogenèse (VEGF), dans le micro-environnement tumoral (FGFR, PDGFR) ou encore dans la progression tumorale (BRAF), peut être utilisé.

2.3.4 La résistance aux traitements

La résistance à la chimiothérapie anticancéreuse est un phénomène complexe et multifactoriel. Cette résistance aux traitements peut, chez certains patients, se révéler d'emblée, il s'agit de résistance « primaire ou innée ». D'autres patients, vont en revanche, avoir un bénéfice thérapeutique immédiat, mais finir par développer une résistance au traitement qui ne sera alors plus efficace, il s'agit de résistance « secondaire ou acquise ». A noter que les tumeurs étant très hétérogènes, il peut y avoir au sein d'une même tumeur des cellules sensibles et des cellules résistantes aux traitements. Dans les CCR, plusieurs mécanismes de résistance aux traitements ont été identifiés tels qu'une diminution de

Introduction

l'entrée des molécules anticancéreuses dans les cellules tumorales, mais également une inactivation et une dégradation des molécules de chimiothérapie ou encore des modifications des cibles moléculaires et des systèmes de réparation de l'ADN.

2.4 Survie globale des patients

La survie à 5 ans, des patients atteints de CCR, tout stade confondu, est d'environ 60%. Cependant, le taux de survie des patients atteints de CCR est dépendant du stade de la maladie, et plus le stade est avancé, moins bon est le pronostic. En effet, le taux de survie est relativement élevé aux stades précoces, il est supérieur à 90 % pour le stade I et d'environ 80 % pour le stade II. Cependant, il diminue fortement pour les stades tardifs III et IV où le taux de survie est respectivement d'environ 45 % et 10 %. La gravité des CCR dépend donc essentiellement du stade de diagnostic et est liée à une forte propension des cellules tumorales à la dissémination métastatique. En outre, la grande hétérogénéité tumorale des CCR et le développement de résistance contribuent à l'échec des traitements. Il est donc nécessaire d'identifier de nouvelles cibles diagnostiques, pronostiques et thérapeutiques ; et de développer des traitements adaptés prenant en compte les différents types de CCR (Lecomte *et al.*, 2019).

Introduction

III- La superfamille des Cadhérines

Le bon fonctionnement de l'intestin dépend d'une étanchéité sélective de l'épithélium, qui est assurée en partie par des complexes d'adhésion que sont les jonctions serrées, les desmosomes et les jonctions adhérentes. Ces dernières sont cruciales pour l'homéostasie intestinale puisqu'elles contribuent non seulement à la fonction de barrière de l'épithélium intestinal, mais également au contrôle de la prolifération et de la différenciation cellulaire. Parmi les protéines impliquées dans les jonctions adhérentes, celles qui jouent un rôle important appartiennent à la superfamille des Cadhérines.

1. Généralités

Les Cadhérines sont des glycoprotéines transmembranaires qui lient le calcium et possèdent pour la plupart des propriétés adhésives. La première Cadhérine décrite est l'E-cadhérine isolée à partir d'embryon de souris au stade morula et appelée Uvomoruline ou L-CAM chez le poulet (Hyafil *et al.*, 1981 ; Gallin *et al.*, 1983). Peu après la découverte de l'E-cadhérine, d'autres Cadhérines comme la P-cadhérine et la N-cadhérine ont été décrites (Miyatani *et al.*, 1989 ; Nose & Takeichi., 1986). Depuis, la superfamille des Cadhérines n'a cessé de croître grâce aux programmes de séquençage du génome, avec aujourd'hui plus de 350 Cadhérines identifiées si l'on inclut les isoformes caractéristiques des différentes espèces animales dont plus de 100 Cadhérines décrites chez l'Homme (Hulpiau & van Roy., 2011).

Les Cadhérines sont des molécules dont l'activité biologique est dépendante du calcium. Tous les membres de cette famille possèdent un domaine extracellulaire multi-modulaire caractérisé par la présence de motifs « cadhérine » d'environ 110 acides aminés qui comportent des sites conservés de fixation des ions calcium DXD (Asp-x-Asp), LDRE (Leu-Asp-Arg-Glu), et DxNDN (Asp-x-Asn-Asp-Asn). Ces acides aminés constituent les éléments structuraux des poches de fixation du calcium situées entre deux motifs extracellulaires consécutifs (Takeichi., 1977 ; Hatta *et al.*, 1988). L'ensemble des données structurales et

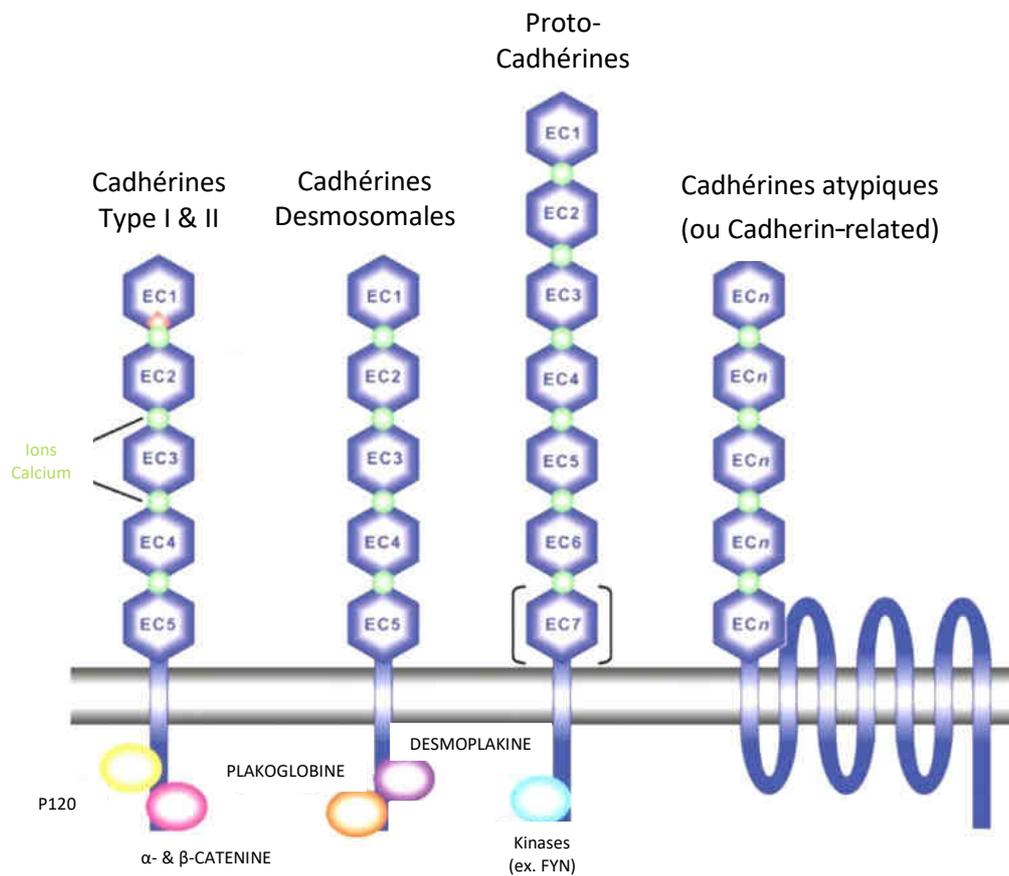


Figure 13. Les différentes classes de la superfamille des Cadhérines.

Toutes les Cadhérines possèdent un motif « cadhérine » répété au niveau de leur région extracellulaire. Le nombre de motifs « cadhérine » peut varier selon la famille, et si les Cadhérines classiques et desmosomales possèdent 5 motifs « cadhérines » extracellulaires (EC), les Proto-Cadhérines et les Cadhérines atypiques possèdent un nombre variable de motifs « cadhérine ». La région intracellulaire des Cadhérines est quant à elle très différente d'une famille à l'autre (D'après [Taneyhill., 2008](#)).

Introduction

fonctionnelles montre que 3 ions calcium se fixent dans chaque poche entre deux motifs cadhérines consécutifs rigidifiant ainsi l'ensemble du fragment extracellulaire des Cadhérines. Cette fixation induit de légers changements conformationnels et participe à la maturité structurale de la protéine fonctionnelle (Boggon *et al.*, 2002). La région cytoplasmique des Cadhérines est plus variable permettant des interactions protéiques diverses et l'activation de nombreuses voies de signalisation intracellulaires.

Selon leur séquence, l'organisation de leurs sous-domaines protéiques et leur origine phylogénétique, les Cadhérines sont regroupées dans différentes familles : les Cadhérines classiques (de type I et de type II), les Cadhérines desmosomales, les Protocadhérines, et les Cadhérines atypiques (ou « Cadherin-related ») (Hulpiau & van Roy., 2011) (**Figure 13**).

1.1 Les Cadhérines classiques

Les Cadhérines classiques sont réparties en deux groupes, type I et type II, sur la base de leurs homologies de séquence. Elles représentent la famille de Cadhérine la plus étudiée et la mieux caractérisée. Principalement localisées au niveau des jonctions adhérentes, les Cadhérines classiques effectuent des liaisons calcium-dépendante homophiliques entre les cellules grâce à leurs 5 EC (motifs cadhérines extracellulaires) (Angst *et al.*, 2001). La famille des Cadhérines de type I comprend plusieurs membres dont l'E-cadhérine (CDH1) exprimée dans les cellules épithéliales et la N-cadhérine (CDH2) exprimée dans les cellules mésenchymateuses. Les Cadhérines classiques de type I présentent de nombreuses homologies de séquence entre elles et des éléments conservés comme un Tryptophane en deuxième position (Trp2). Les Cadhérines de type II comme la VE-cadhérine exprimée au niveau des cellules endothéliales, présentent de fortes homologies de séquence avec celles de type I, mais ne possèdent pas le motif (Pro5-Pro6) qui favorise la dimérisation des Cadhérines de type I. En revanche, les Cadhérines de type II possèdent une surface d'interaction plus étendue suggérant des interactions plus fortes que les Cadhérines de type I (Parisini *et al.*, 2007 ; Patel *et al.*, 2006). La région intracellulaire des Cadhérines classiques

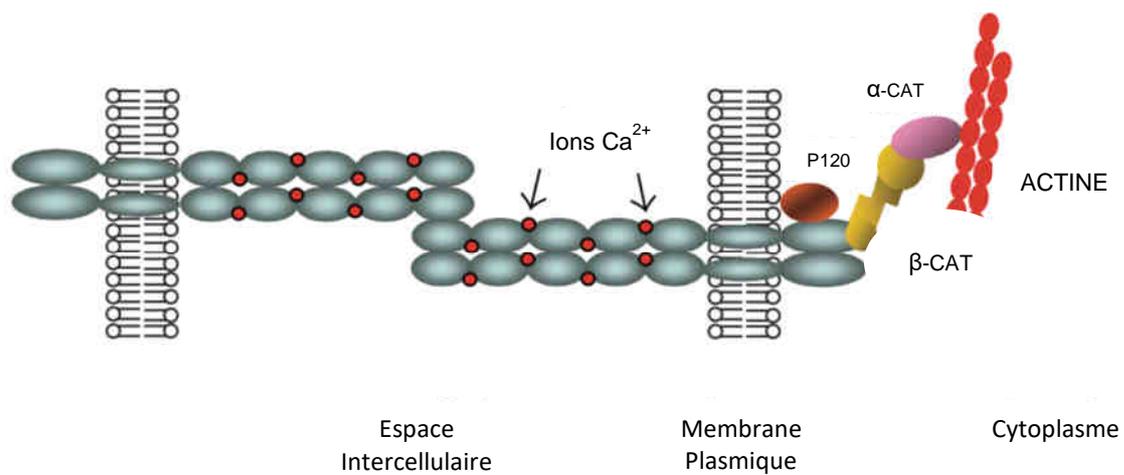


Figure 14. Structure des Cadhérines classiques et interaction de leur domaine cytoplasmique.

La région extracellulaire des Cadhérines classiques interagit en outre avec d'autres Cadhérines, tandis que la région intracellulaire se lie aux Caténines cytoplasmiques (α -CAT & β -CAT) qui vont servir d'intermédiaires entre les Cadhérines et les filaments d'Actine. L'ensemble de ce complexe d'interaction protéique est primordial pour une jonction cellule/cellule stable (D'après Gama & Schmitt., 2012).

Introduction

est relativement conservée et permet l'interaction avec des protéines cytoplasmiques. Le domaine intracellulaire des Cadhérines classiques peut interagir avec les Caténines comme par exemple la β -caténine, permettant de lier plus ou moins directement la Cadhérine au cytosquelette d'Actine contribuant ainsi à la stabilité du complexe d'adhésion (Solanas & Batlle., 2011) (Figure 14).

Des études ont permis de montrer que l'E-cadhérine, exprimée dans les entérocytes, participe à l'homéostasie intestinale. En effet, la perte d'expression de cette Cadhérine dans l'épithélium intestinal murin provoque des diarrhées hémorragiques et a des conséquences dramatiques sur de nombreux processus cellulaires comme l'adhésion, la polarité apico-basale, la survie, la migration, ou encore la différenciation (Schneider *et al.*, 2010).

De manière intéressante, les Cadhérines classiques comme l'E-cadhérine et la N-cadhérine peuvent également interagir avec d'autres types de récepteurs membranaires tels que l'EGFR, le FGFR et l'IGF-IR (Hoschuetzky *et al.*, 1994 ; Williams *et al.*, 1994 ; Morali *et al.*, 2001). L'E-cadhérine est notamment capable d'interagir avec l'EGFR dans les cellules humaines. De plus, l'activation de l'EGFR permet de réguler et d'augmenter l'expression de l'E-cadhérine (Sorscher *et al.*, 1995). La relation entre ces deux protéines est bi-directionnelle, et si l'EGFR est capable d'agir sur l'E-cadhérine, l'E-cadhérine peut également influencer l'EGFR soit en l'activant (Pece & Gutking., 2000), soit en l'inhibant. Les travaux de Qian *et al.*, ont permis de montrer que lorsque les cellules MDCK présentent une faible densité cellulaire, le récepteur de l'EGF peut être activé, tandis que lorsque les cellules présentent une forte expression de l'E-cadhérine et de nombreuses jonctions adhérentes, l'EGFR ne présente pas d'activité. Ceci s'explique par l'interaction entre l'E-cadhérine et l'EGFR qui entraîne l'inhibition de ce dernier, probablement lié à une altération de l'affinité de liaison entre l'EGFR et son ligand (Qian *et al.*, 2004). La perte d'expression de l'E-cadhérine dans certaines pathologies entraîne une diminution des jonctions cellulaires et donc une augmentation de l'activation de l'EGFR (Heijink *et al.*, 2007).

Introduction

1.2 Les Cadhérines desmosomales

Les Cadhérines desmosomales sont présentes dans les tissus soumis à de fortes tensions mécaniques et sont impliquées dans la formation de structures adhésives particulières : les desmosomes. Il existe deux types de Cadhérines desmosomales : les Desmocollines (DSC) et les Desmogléines (DSG), qui comme les Cadhérines classiques possèdent un domaine extracellulaire composé de 5 motifs « cadhérine » (Marcozzi *et al.*, 1998). La DSG1 présente la particularité d'un motif EC5 plus court qu'un motif EC habituel. Leur région intracellulaire présente des domaines de liaison aux protéines Plakoglobine/Plakophiline (possédant un domaine Armadillo) qui, par fixation à la Desmoplakine, permettront l'ancrage au cytosquelette via les filaments intermédiaires (Dusek & Attardi., 2011). Au niveau de l'épithélium intestinal, les Cadhérines DSC2 et DSG2 sont impliquées dans les complexes d'adhésion qui assurent l'intégrité de la barrière intestinale (Khan *et al.*, 2006 ; Schlegel *et al.*, 2010).

1.3 Les Protocadhérines

Cette famille réunit le plus grand nombre de Cadhérines connues avec plus de 60 membres. Les Protocadhérines (PCDH) sont présentes chez les mammifères mais également chez les invertébrés, et sont essentiellement exprimées dans le système nerveux central (Hulpiau & van Roy., 2011). Deux types de gènes *PCDH* ont été définis, les *PCDH* non regroupés qui sont dispersés dans le génome ; et les *PCDH* groupés organisés en trois clusters : α , β et γ (van Roy., 2014). Au niveau structural, ces Cadhérines possèdent un domaine cytoplasmique qui diffère de celui des Cadhérines classiques et leur domaine extracellulaire peut posséder jusqu'à 7 motifs « cadhérine ». Les Protocadhérines forment entre elles des liaisons homophiliques qui ne semblent pas forcément dépendre du calcium, suggérant que ces protéines sont préférentiellement impliquées dans des mécanismes de reconnaissance et de communication cellulaires (Halbleib & Nelson., 2006).

Introduction

1.4 Les Cadhérines atypiques

Les Cadhérines atypiques appartiennent à la famille des Cadhérines la moins étudiée et la moins bien caractérisée à ce jour. Cette famille regroupe des protéines très diverses dont la séquence et les sous-domaines divergent beaucoup de ceux des autres Cadhérines et qui ne possèdent pas beaucoup d'homologies entre elles. Certains membres de cette famille se distinguent par la présence de motifs « cadhérine » surnuméraires ou de motifs particuliers au niveau de leur domaine extracellulaire. C'est le cas par exemple des Cadhérines FAT et DACHSOUS qui possèdent respectivement 34 et 27 domaines EC et qui jouent un rôle primordial dans la polarisation tissulaire (Hulpiau *et al.*, 2013 ; Sharma & McNeill., 2013). La Cadhérine CDHR15 présente, elle aussi un nombre surnuméraire de motifs Cadhérines, et possède 11 EC. Cette dernière intervient au niveau des stéréocils de l'oreille interne et joue un rôle dans l'audition (Araya-Secchi *et al.*, 2016). La Cadhérine atypique MUCDHL quant à elle, ne possède, au niveau de son domaine extracellulaire, que 4 motifs « cadhérine ». Elle se distingue également des autres Cadhérines par la présence de motifs particuliers de type mucine au niveau du domaine extracellulaire de l'une de ses isoformes (Goldberg *et al.*, 2000). D'autres membres de cette famille se distinguent par un ancrage membranaire particulier. C'est le cas de la T-cadhérine qui est associée à la membrane plasmique par une ancre glycosyl-phosphatidylinositol et qui ne possède pas de domaine transmembranaire et cytoplasmique. En revanche, son domaine extracellulaire est composé comme pour les Cadhérines classiques de 5 motifs « cadhérine » (Philippova *et al.*, 2006). Enfin, la LI-cadhérine qui semble jouer un rôle dans la formation et le maintien de la barrière intestinale, ne possède quasiment pas de domaine intracellulaire (Baumgartner., 2013).

2. Cadhérines et cancers

La capacité des cellules tumorales à croître de façon incontrôlée, migrer, envahir les tissus environnants et métastaser est souvent associée à la perturbation des interactions cellulaires assurées par les Cadhérines. En effet, outre le maintien des jonctions cellulaires,

Introduction

les interactions entre Cadhérines affectent des voies de signalisation cellulaires régulant la croissance, la polarité ou encore la migration des cellules (van Roy., 2014).

L'E-cadhérine est la Cadhérine la plus étudiée dans le cancer et il a été montré que son expression est fréquemment perdue dans les tumeurs épithéliales et notamment dans les CCR. Plusieurs mécanismes semblent jouer un rôle dans cette dérégulation comme des mutations provoquant une perte de fonction et/ou une perte d'hétérozygotie, ou encore une hyperméthylation du gène qui est retrouvée dans 46 % des CCR (Bex & van Roy., 2009 ; Wheeler *et al.*, 2001 ; Garinis *et al.*, 2002). Il a également été montré que la perte de l'E-Cadhérine augmente la résistance à l'anoïkis, la migration cellulaire et le potentiel invasif des cellules tumorales mammaires (Onder *et al.*, 2008). Cette perte de l'E-cadhérine peut être associée à une transition épithélio-mésenchymateuse qui est un processus essentiel durant l'embryogenèse et la réparation tissulaire chez l'adulte. En revanche, la transition épithélio-mésenchymateuse dans les cellules épithéliales tumorales est un facteur favorisant la progression tumorale. La transition épithélio-mésenchymateuse est caractérisée par une perte de l'adhésion cellulaire et s'accompagne parfois d'une substitution de l'E-cadhérine par la N-cadhérine ce qui facilite les phénomènes d'invasion cellulaire et de formation des métastases (Brabletz *et al.*, 2005).

Au niveau des jonctions adhérentes, l'E-cadhérine interagit avec la β -caténine qui est la protéine centrale de la voie WNT. Au-delà de son rôle dans l'adhésion, l'interaction entre l'E-cadhérine et la β -caténine permet de diminuer l'activité transcriptionnelle de la voie WNT canonique par séquestration membranaire de la β -caténine, diminuant ainsi l'activité de gènes cibles impliqués dans la prolifération et la migration cellulaire (Gottardi *et al.*, 2001 ; Wong & Pignatelli., 2002). Des expériences *in vivo* réalisées chez la souris ont mis en évidence, qu'en présence d'un système intact de dégradation de la β -caténine, la perte de l'E-cadhérine est insuffisante pour induire une localisation nucléaire de la β -caténine. En revanche, la diminution de l'E-cadhérine dans un contexte de perte de fonctions de APC ou de GSK3 dans les cellules coliques tumorales entraîne une augmentation de l'activité oncogénique de la β -caténine et favorise la transition des adénomes en carcinomes, associée à une propagation métastatique. L'augmentation de l'E-cadhérine associée à un système de

Introduction

dégradation de la β -caténine perturbé, permet d'éviter la localisation nucléaire de la β -caténine et contrebalance ainsi sa signalisation pro-tumorale. Les conséquences liées aux variations d'expression de l'E-cadhérine sont dépendantes du contexte (Huels *et al.*, 2015).

Outre l'E-cadhérine, d'autres Cadhérines classiques peuvent être dérégulées dans les CCR. C'est le cas du gène *CDH4* qui présente une hyperméthylation dans plus de 70 % des cas (Miotto *et al.*, 2004). L'expression de la Cadhérine CDH13, qui a un rôle de suppresseur de tumeur, est également diminuée dans les cancers du sein, les cancers du poumon et les cancers colorectaux (Toyooka *et al.*, 2001 ; Toyooka *et al.*, 2002). Le niveau d'expression de la Cadhérine desmosomale DSC2 est lui aussi diminué dans les CCR et ceci est associé à une prolifération cellulaire accentuée, conséquence de l'activation de la voie AKT (Khan *et al.*, 2006 ; Kolegraff *et al.*, 2011). La Cadhérine atypique CDHR2 (PCDH24) est également impliquée dans le processus tumoral colique. En effet, une perte d'expression de CDHR2 a été observée dans les CCR, provoquant une dérégulation de l'activité de la β -caténine (Okazaki *et al.*, 2002 ; Ose *et al.*, 2009). Il a également été montré que CDHR2 possède un rôle de suppresseur de tumeur et que CDHR2 est diminué dans les lignées cellulaires et les tissus de carcinomes hépatocellulaires. En effet, les auteurs ont montré que les souris inoculées avec des cellules de carcinome hépatocellulaire exprimant CDHR2 présentent une réduction de la croissance tumorale et de l'incidence tumorale par rapport à celles inoculées avec des cellules de carcinome hépatocellulaire témoin. Les données de micropuces à protéines indiquent une baisse d'activité de la voie AKT dans les cellules surexprimant CDHR2, suggérant que le rôle de suppresseur de tumeur de CDHR2 soit en partie dû à l'inactivation de AKT (Xia *et al.*, 2019).

Si de nombreuses Cadhérines ont une expression diminuée, certaines peuvent avoir une expression augmentée, notamment dans les stades avancés de CCR. La surexpression de la LI-cadhérine ou l'expression ectopique de CDH3 pourraient être associées à une croissance tumorale et à la formation de métastases (van Roy *et al.*, 2014).

Enfin, certaines Cadhérines peuvent être mutées dans les cancers, comme par exemple la Cadhérine atypique FAT1, ce qui conduit à une activation aberrante de la voie WNT (Morris *et al.*, 2013).

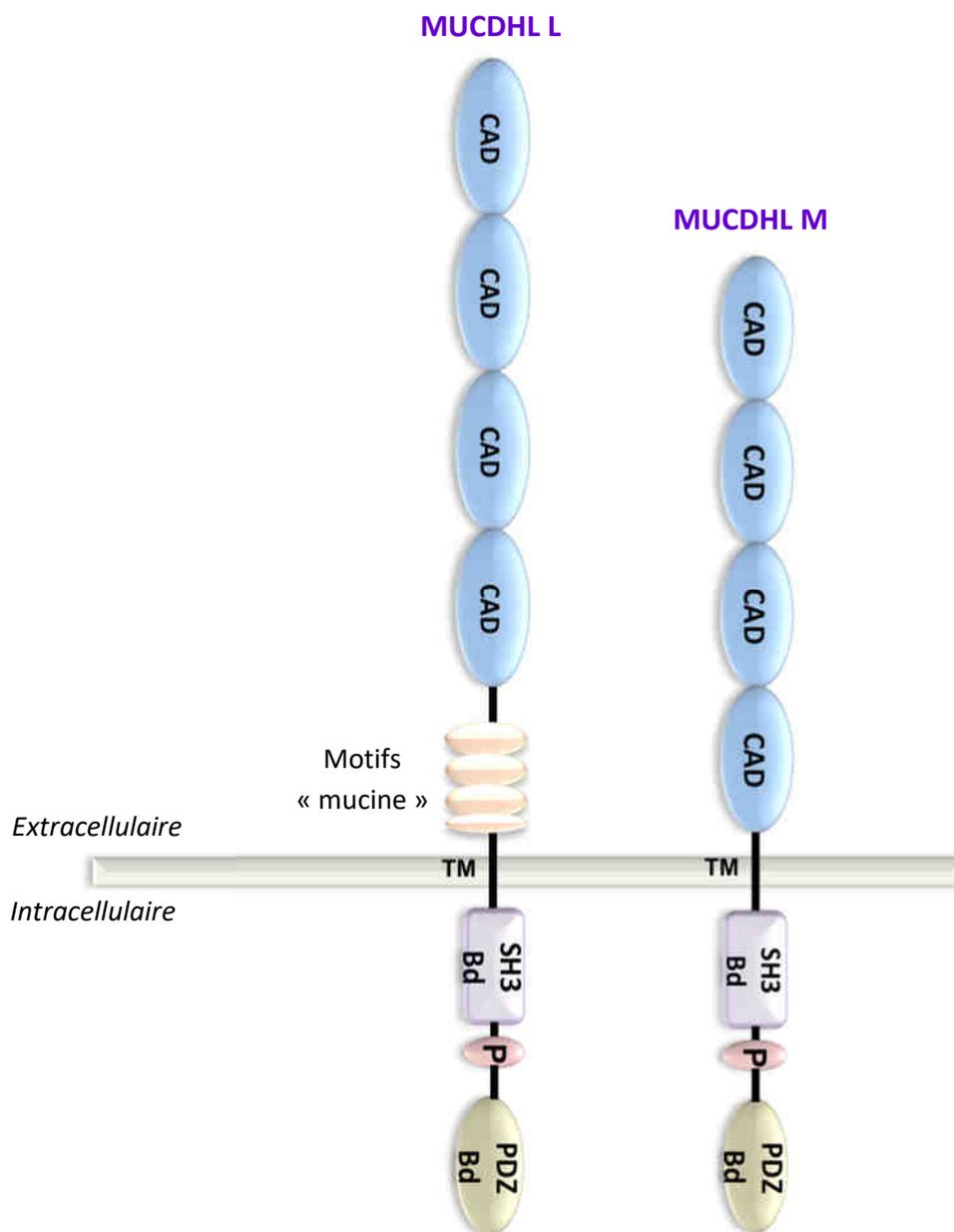


Figure 15. Représentation schématique des isoformes MUCDHL L et M.

Les deux isoformes MUCDHL L (845 aa) et M (651 aa) présentent 4 motifs « cadhérine » (CAD) dans la région extracellulaire, un domaine transmembranaire (TM), une séquence riche en résidus Proline (P) permettant la liaison des protéines à domaine SH3 au domaine SH3 binding (SH3 Bd) et un domaine de liaison aux protéines PDZ (PDZ Bd). L'isoforme L diffère de l'isoforme M par la présence de 3,5 motifs « mucine » dans sa partie extracellulaire (D'après [Moulton et al., 2004](#)).

Introduction

IV- La Cadhérine atypique MUCDHL

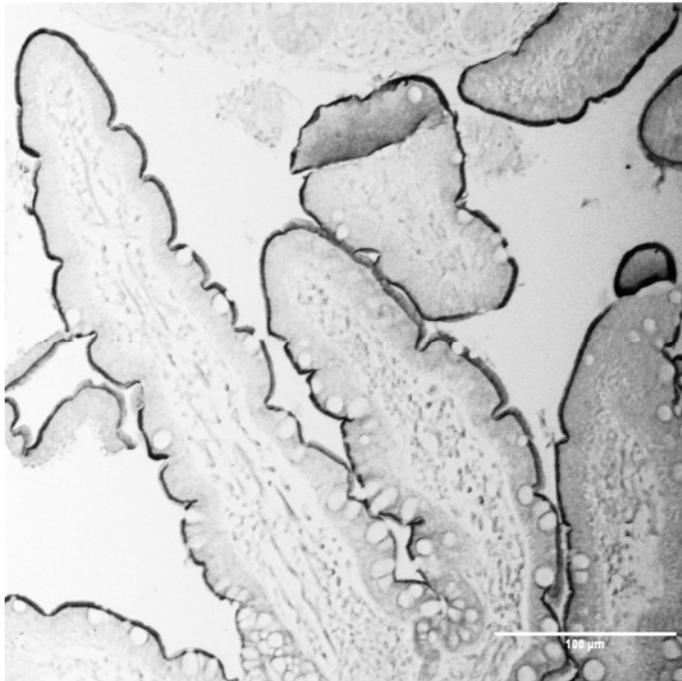
1. Généralités

1.1 Structure de MUCDHL

Le gène *MUCDHL* (ou *CDHR5*) est localisé au niveau du chromosome 11p15.5 chez l'homme et possède des homologues chez la souris et le rat. MUCDHL appartient à la famille des gènes apparentés aux Cadhérines qui codent pour des Cadhérines atypiques. MUCDHL possède une structure particulière dont l'homologie globale avec les Cadhérines classiques est relativement faible puisqu'elle est inférieure à 30 %.

Plusieurs isoformes de MUCDHL peuvent être générées par épissage alternatif. Dans les cellules intestinales humaines, deux isoformes principales ont été identifiées : MUCDHL L et MUCDHL M. MUCDHL L est l'isoforme longue de 845 acides aminés et MUCDHL M est l'isoforme moyenne de 651 acides aminés. Les deux isoformes présentent un domaine extracellulaire à 4 motifs « cadhérine » responsable des liaisons dépendantes du Ca^{2+} entre Cadhérines. Les domaines extracellulaires de MUCDHL sont similaires entre eux, mais diffèrent de ceux des autres membres de la superfamille des Cadhérines. De plus, l'isoforme L diffère de l'isoforme M au niveau de la région extracellulaire par la présence atypique de répétitions en tandem de motifs de type mucine comportant 31 acides aminés, riches en Proline, Thréonine et Sérine. MUCDHL présente également un court domaine transmembranaire (TM) et un domaine intracellulaire. Le domaine intracellulaire de MUCDHL comprend une zone riche en résidus Proline, comportant des motifs PXXP qui peuvent interagir avec des domaines SH3. Il comprend également un motif de liaison au domaine PDZ. La partie intracellulaire de MUCDHL est complètement distincte de celle des autres Cadhérines à l'exception des protéines FAT et CDHR2 qui possèdent également un domaine de fixation aux protéines à domaine PDZ. La Cadhérine la plus proche de MUCDHL serait la Cadhérine atypique FAT (Goldberg *et al.*, 2000 ; Moulton *et al.*, 2004) (Figure 15).

Intestin grêle



Côlon

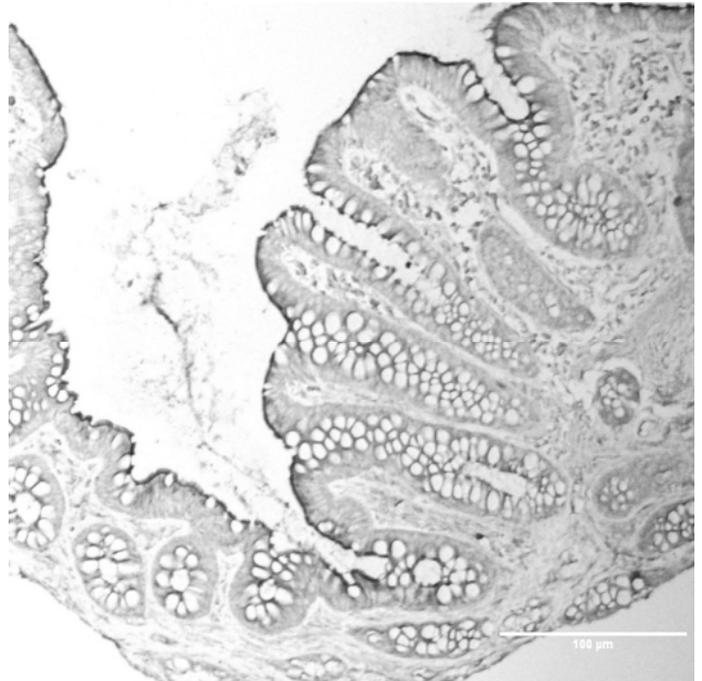


Figure 16. Expression de MUCDHL dans l'épithélium intestinal humain.

Les protéines MUCDHL sont exprimées dans les cellules épithéliales différenciées de l'intestin grêle et du côlon humain. Leur localisation membranaire est détectée au niveau latéral, mais principalement au niveau apical (Données internes INSERM U1113).

Introduction

1.2 Expression et régulation de MUCDHL

L'étude du profil d'expression de *MUCDHL* par Northern blot ou RT-PCR suggère une expression assez restreinte de *MUCDHL* dans le rein, le foie et l'intestin (Goldberg *et al.*, 2000 ; Moulton *et al.*, 2004). De façon curieuse, l'ADNc de *MUCDHL* a aussi été isolé à partir d'une lignée de cellules pancréatiques de rat AR42J, mais à ce jour, l'expression au niveau du pancréas murin ou humain n'a pas été confirmée (Moulton *et al.*, 2004). Au niveau de l'intestin, l'expression de *MUCDHL* est détectée à partir de E16.5 chez l'embryon murin, ce qui coïncide avec la cytodifférenciation des cellules intestinales (Hinkel *et al.*, 2012).

Dans le rein, l'expression de *MUCDHL* est spécifique des cellules épithéliales différenciées des tubules contournés proximaux. Au niveau de l'épithélium intestinal, l'expression de *MUCDHL* est également détectée dans les cellules épithéliales différenciées. De manière inattendue pour une Cadhérine, l'expression de *MUCDHL* est non seulement localisée au niveau latéral, mais également au pôle apical des cellules intestinales ou rénales, au niveau des microvillosités de la bordure en brosse. (Goldberg *et al.*, 2000 ; Moulton *et al.*, 2004 ; Hinkel *et al.*, 2012) (**Figure 16**). La localisation apicale de *MUCDHL* est dépendante de son domaine extracellulaire, puisque la délétion de ce dernier entraîne une localisation latérale de *MUCDHL* (Goldberg *et al.*, 2002). De plus, il semblerait que la localisation apicale dans les cellules intestinales dépende du degré de polarisation et de différenciation des cellules. En effet, plus les cellules intestinales sont différenciées, plus la localisation de *MUCDHL* est apicale (Moulton *et al.*, 2004 ; Knowles *et al.*, 2015). Ces données laissent suggérer un potentiel rôle différent de *MUCDHL* en fonction de sa localisation cellulaire.

Des études réalisées au sein du laboratoire ont permis de montrer que *MUCDHL* est une cible transcriptionnelle directe du facteur de transcription homéotique CDX2 qui est impliqué dans le développement embryonnaire, dans l'identité des cellules intestinales, dans l'homéostasie de l'épithélium intestinal et qui agit comme un suppresseur de tumeur au niveau du côlon (Hinkel *et al.*, 2012 ; Bonhomme *et al.*, 2003). Le niveau d'expression de

Introduction

MUCDHL est diminué dans des conditions physiopathologiques caractérisées par une baisse de CDX2. En outre, la suppression de l'expression de CDX2 par ARN interférents dans des cellules intestinales diminue nettement l'expression de MUCDHL. A l'inverse, la surexpression de CDX2 dans les cellules intestinales cancéreuses HCT116 et SW480, et les cellules HEK293 stimule l'expression de MUCDHL. Des expériences d'immunoprécipitation de chromatine et de gènes rapporteurs ont montré que la stimulation par CDX2 nécessite deux sites de liaison au niveau du promoteur de *MUCDHL*. Il n'existe cependant pas de concordance parfaite de l'expression de MUCDHL avec celle de CDX2. En effet, l'expression de CDX2 apparaît plus précocement au cours du développement embryonnaire et présente un profil d'expression plus large dans l'épithélium intestinal que MUCDHL (Hinkel *et al.*, 2012). Ces résultats suggèrent la probable implication d'autres facteurs de transcription dans la régulation de l'expression de *MUCDHL*, tels que HNF4 α et PPAR γ (Bersuder *et al.*, en préparation^a).

De manière intéressante, l'expression de MUCDHL est altérée dans les pathologies intestinales, mais également dans certains cancers comme les cancers rénaux. Des études ont montré que l'expression de MUCDHL est fortement réduite dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, mais surtout dans 70 % des cancers coliques (Losi *et al.*, 2011 ; Hinkel *et al.*, 2012 ; Bläsius *et al.*, 2017).

La diminution d'expression de MUCDHL dans les tumeurs coliques peut s'expliquer par un phénomène d'hyperméthylation de son promoteur. Une augmentation croissante du taux de méthylation du gène *MUCDHL* est observée lors de la progression tumorale. En effet, le taux de méthylation du gène *MUCDHL* est plus faible dans la muqueuse saine comparé à celui de la muqueuse des adénomes ; lui-même inférieur à celui retrouvé dans la muqueuse des carcinomes. De plus, un traitement par un inhibiteur de DNA méthyltransférase permet d'augmenter la faible expression de *MUCDHL* dans les lignées cellulaires cancéreuses coliques HCT116 et SW480 (Bujko *et al.*, 2015). La baisse d'expression de MUCDHL peut également être expliquée par une baisse concomitante de son facteur de transcription CDX2, puisque le niveau d'expression de MUCDHL est diminué dans des conditions

Introduction

physiopathologiques caractérisées par une baisse de CDX2 (Hinkel *et al.*, 2012). Enfin, une régulation négative de MUCDHL par la voie WNT/ β -caténine a été mise en évidence récemment. Cette régulation négative pourrait contribuer à la baisse d'expression de MUCDHL dans les tumeurs du côlon présentant une activation constitutive de la voie WNT/ β -caténine. En effet, il a été montré que l'inhibition de TCF4 ou la diminution de la signalisation WNT dans des lignées cancéreuses coliques ou des organoïdes coliques entraîne une augmentation de l'expression de MUCDHL. A l'inverse, la stabilisation de la β -caténine entraîne une diminution de l'expression de MUCDHL dans les organoïdes coliques. Toutefois, le mécanisme d'inhibition n'a pas encore été caractérisé (Montorsi *et al.*, 2016). Par ailleurs, le traitement de cellules cancéreuses coliques avec un anti-inflammatoire nommé Mésalazine (5-ASA) augmente l'expression de MUCDHL, ce qui serait responsable de l'effet inhibiteur du 5-ASA sur la β -caténine (Parenti *et al.*, 2010).

2. Fonction et mode d'action de MUCDHL

Bien que la séquence primaire de MUCDHL soit assez différente de celle des Cadhérines classiques, MUCDHL possède des propriétés fonctionnelles similaires à ces dernières. En effet, MUCDHL peut comme l'E-cadhérine augmenter l'adhésion intercellulaire. L'expression ectopique de MUCDHL L entraîne une augmentation de l'agrégation de cellules fibroblastiques murines (L929) de manière Ca^{2+} -dépendante, et la région cytoplasmique de MUCDHL est nécessaire à ce phénomène puisque sa délétion altère la capacité d'agrégation de MUCDHL (Goldberg *et al.*, 2000).

Un rôle original de MUCDHL a plus récemment été mis en évidence dans les cellules intestinales. En effet, MUCDHL est impliqué dans des interactions intermicrovillositaires Ca^{2+} -dépendantes et hétérophiliques qui s'effectuent avec la Cadhérine atypique CDHR2 dont la localisation est également apicale au niveau des entérocytes. En interagissant ensemble, ces deux Cadhérines forment des ponts entre les microvillosités adjacentes de la bordure en brosse intestinale. Au niveau cellulaire, le complexe protéique MUCDHL/CDHR2

Introduction

interagit avec l'Harmonine et la Myosine 7b (Crawley *et al.*, 2014). L'Harmonine est une protéine d'échafaudage recrutée au complexe via l'un de ses domaines PDZ. La Myosine 7b permet quant à elle de stabiliser le complexe protéique en l'ancrant au faisceau d'Actine des microvillosités. Ce phénomène d'adhésion intermicrovillositaire médié par des Cadhérines n'avait à ce jour jamais été décrit dans un contexte intestinal ; mais un phénomène similaire de liaison de stéréocils par des protéines apparentées aux Cadhérines existe dans l'oreille interne (Araya-Scchi *et al.*, 2016). L'absence de MUCDHL ou de CDHR2 obtenue par interférence à l'ARN empêche le regroupement des microvillosités et la formation de la bordure en brosse dans des cellules intestinales en culture. En outre, l'étude de souris déficientes pour l'Harmonine a permis de mettre en évidence de nombreuses altérations morphologiques de la bordure en brosse intestinale. L'ensemble de ces résultats suggère l'importance du complexe d'adhésion intermicrovillositaire (IMAC) constitué de MUCDHL, CDHR2, Harmonine et Myosine 7b pour la formation de la bordure en brosse intestinale (Crawley *et al.*, 2014).

De plus, des études de MUCDHL indiquent un rôle dans l'intestin de MUCDHL au niveau morphologique, mais également au niveau du fonctionnement de ce dernier. Les études réalisées au laboratoire sur des souris dépourvues de *MUCDHL* indiquent que l'absence de MUCDHL conduit à de nombreuses anomalies structurales des microvillosités. En effet, les microvillosités présentent des structures altérées, sont désorganisées, plus petites et moins nombreuses. Ces résultats sont donc en accord avec les résultats *in vitro* de Crawley *et al.* Parallèlement à ces altérations morphologiques, l'étude des souris dépourvues de *MUCDHL* a permis de montrer que l'absence de MUCDHL affecte le fonctionnement normal de l'intestin, conduisant notamment à la formation de fèces anormales, moins compactes et d'aspect graisseux. Ces souris présentent également des anomalies phénotypiques et des défauts du métabolisme comme une surcharge pondérale, une hypercholestérolémie, une altération du cycle entéro-hépatique ou encore une intolérance au glucose (Baranger *et al.*, en préparation). Les souris dépourvues de *MUCDHL* sont également plus sensibles à l'inflammation et présentent un temps de régénération de la muqueuse intestinale plus lent que les souris exprimant *MUCDHL* (Bersuder *et al.*, en préparation^b).

Introduction

Enfin, la baisse d'expression de MUCDHL dans certains cancers suggère l'implication de MUCDHL dans ces pathologies et l'investigation de la fonction et du mode d'action de MUCDHL ont permis d'obtenir des résultats en concordance avec un éventuel rôle de suppresseur de tumeur exercé par MUCDHL. Des tests *in vitro*, réalisés avec des cellules cancéreuses HCT116 surexprimant ou non MUCDHL, ont révélé la capacité de MUCDHL à réduire drastiquement la formation des colonies cellulaires, que ce soit sur plastique (clonogénicité) ou dans l'agar mou (croissance sans ancrage). Si les deux isoformes de MUCDHL sont capables de réduire le nombre de colonies, l'isoforme MUCDHL L réduit plus faiblement le nombre de colonies comparé à l'isoforme MUCDHL M. En outre, des expériences *in vivo* réalisées sur des souris nude, auxquelles ont été injectées en sous-cutané des cellules cancéreuses coliques HCT116 surexprimant MUCDHL L ou MUCDHL M de façon inductible, montrent que l'expression de MUCDHL L ou MUCDHL M réduit considérablement la taille des tumeurs formées par ces cellules. Ainsi, ces données suggèrent que MUCDHL peut s'opposer à la formation des tumeurs coliques *in vivo* (Hinkel *et al.*, 2012).

L'effet protecteur contre la tumorigenèse colique de MUCDHL rappelle celui exercé par la Cadhérine classique E-cadhérine capable d'interagir avec la β -caténine et d'inhiber son activité transcriptionnelle (Gottardi *et al.*, 2001). Par analogie, l'interaction entre MUCDHL et la β -caténine a été étudiée. Les travaux réalisés ont permis de mettre en évidence une inhibition de l'activité transcriptionnelle de la β -caténine par MUCDHL M (Hinkel *et al.*, 2012). Ces résultats sont compatibles avec les observations de Losi *et al.*, qui ont analysé la localisation sub-cellulaire de la β -caténine sur des coupes de tumeurs de côlon humaines en fonction de l'expression de MUCDHL : ils ont pu observer une localisation nucléaire de la β -caténine dans les échantillons dépourvus de MUCDHL et une localisation membranaire de la β -caténine dans les tissus exprimant MUCDHL, ce qui suggère un impact de MUCDHL sur la translocation nucléaire de la β -caténine (Losi *et al.*, 2011).

L'ensemble de ces résultats suggère un potentiel rôle de suppresseur de tumeur de MUCDHL au niveau intestinal dont le mécanisme d'action n'est pas encore complètement élucidé à ce jour. L'effet inhibiteur de MUCDHL M sur la β -caténine pourrait en partie expliquer son

Introduction

activité anti-tumorale puisque cette dernière est une actrice majeure de la tumorigenèse colique. Néanmoins, ce n'est probablement pas le seul mécanisme mis en jeu par MUCDHL, puisque l'isoforme MUCDHL L est capable de s'opposer à la tumorigenèse intestinale bien qu'elle n'interagisse pas avec la β -caténine et qu'elle n'inhibe pas son activité transcriptionnelle.

OBJECTIFS

Avec plus de 44 500 nouveaux cas diagnostiqués en France en 2017, le cancer colorectal (CCR) est un cancer très fréquent. La gravité des CCR dépend essentiellement du stade de diagnostic, et la survie nette des patients à 5 ans, tout stade confondu, n'est que de 60 %. En outre, la grande hétérogénéité tumorale des CCR et le développement de résistances contribuent à l'échec des traitements actuels. Il est donc nécessaire d'identifier de nouvelles cibles pronostiques et thérapeutiques, afin d'améliorer la prise en charge des patients.

La plupart des tumeurs du côlon sont des adénocarcinomes sporadiques qui résultent d'une succession de transitions de l'épithélium sain, vers l'adénome, puis le carcinome. En contact permanent avec des substances potentiellement délétères, l'épithélium intestinal est le siège d'un renouvellement cellulaire important. Le maintien de la polarité et de l'adhésion intercellulaire dans un épithélium en régénération permanente est un phénomène complexe progressivement perturbé par l'âge, le mode de vie ou encore l'inflammation comme les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. Au niveau moléculaire, ceci s'accompagne d'altérations de gènes tels que *APC*, *KRAS*, *PI3K*, *TP53*, impliqués dans les voies de signalisation qui contrôlent l'homéostasie intestinale. Par exemple, la voie WNT, qui régule le maintien des cellules souches et la prolifération des cellules progénitrices intestinales, est constitutivement activée dans la plupart des CCR et est impliquée dans l'initiation et la progression tumorale.

Dans ce contexte, l'équipe dans laquelle j'effectue mes travaux de thèse étudie depuis quelques années *MUCDHL*, un gène appartenant à la superfamille des Cadhérines. Les données de l'équipe et d'autres laboratoires suggèrent que *MUCDHL* agit comme un suppresseur de tumeurs dans l'épithélium intestinal. En effet, l'expression de *MUCDHL* semble fréquemment perdue dans les tumeurs du côlon et la restauration de l'expression de *MUCDHL* dans des cellules cancéreuses coliques diminue leur potentiel tumoral *in vitro* et *in vivo*. Sur le plan moléculaire, l'équipe a montré que *MUCDHL* M peut interagir avec la β -caténine et inhiber son activité transcriptionnelle. Néanmoins, il existe encore peu d'informations concernant le mode d'action moléculaire de *MUCDHL*.

Sur ces bases, mes travaux de thèse s'inscrivent dans le cadre d'une étude exhaustive de la fonction anti-tumorale de *MUCDHL* réalisée par l'équipe, et visent plus particulièrement à décrypter le mode d'action moléculaire impliqué dans celle-ci. Je me suis notamment

focalisée sur l'étude des protéines pouvant interagir avec MUCDHL et susceptibles de relayer ou moduler son activité anti-tumorale.

Les deux objectifs qui composaient mon projet de thèse étaient les suivants :

- **Objectif 1** : *Caractériser au niveau moléculaire le mode d'action anti-tumoral de MUCDHL*, qui est encore mal compris et pourrait affecter de nombreux processus cellulaires tels que l'adhésion, la prolifération ou la polarité cellulaire.

- **Objectif 2** : *Identifier de nouveaux relais moléculaires ou modulateurs de l'activité anti-tumorale de MUCDHL*, en recherchant de nouveaux interactants et en étudiant les conséquences fonctionnelles de leur interaction avec MUCDHL.

RESULTATS

Projet I

Caractériser au niveau moléculaire le mode d'action anti-tumoral
de MUCDHL

Résultats

I- Résumé des résultats obtenus

1. La perte d'expression de *MUCDHL* favorise la tumorigenèse intestinale

Des études antérieures ont montré que l'expression de *MUCDHL* est diminuée dans les cancers colorectaux chez l'homme (Losi *et al.*, 2011) et que sa surexpression dans des cellules cancéreuses coliques réduit la croissance tumorale chez la souris nude (Hinkel *et al.*, 2012). Dans ce contexte, nous avons étudié l'expression du gène *MUCDHL* dans plus de 500 tumeurs provenant de patients atteints de cancers du côlon, et nos résultats indiquent une diminution de l'expression de *MUCDHL* dans les tumeurs coliques, spécialement dans le sous-type moléculaire C4 caractérisé par un phénotype cellules souches, une voie WNT activée, et de mauvais pronostic ; et dans le sous-type moléculaire C5 présentant une voie WNT activée et de mauvais pronostic (Marisa *et al.*, 2013). En outre, l'analyse de la survie des patients en fonction du niveau d'expression de *MUCDHL* montre une baisse de la survie globale chez les patients présentant des niveaux faibles de *MUCDHL*. Ces résultats mettent en évidence que la diminution de *MUCDHL* aggrave la tumorigenèse intestinale chez l'homme.

Afin de confirmer que *MUCDHL* agit comme un suppresseur de tumeurs dans l'intestin, nous avons étudié l'impact de l'absence de *MUCDHL* sur la tumorigenèse dans un contexte pro-tumoral lié à la perte du gène *APC*. Pour cela, des souris dépourvues de *Mucdhl* ou des souris *Mucdhl* sauvage ont été croisées à des souris *Apc*^{Δ14/+} développant spontanément des tumeurs intestinales. Les résultats indiquent que la perte de *MUCDHL* favorise la tumorigenèse intestinale en augmentant sa fréquence et sa charge tumorale. Les souris *Apc*^{Δ14/+}; *Mucdhl*^{-/-} développent un nombre plus important de tumeurs que les souris *Apc*^{Δ14/+}; *Mucdhl*^{+/+} et particulièrement un nombre de tumeur de plus grande taille. En revanche, l'histologie des tumeurs est similaire et la localisation sub-cellulaire de la β-caténine est à la fois cytoplasmique et nucléaire pour les deux groupes de souris.

Résultats

Néanmoins, l'ensemble de ces résultats démontre que la perte de l'expression de *MUCDHL* est un facteur favorisant le développement des tumeurs intestinales.

2. MUCDHL inhibe l'activité transcriptionnelle de la β -caténine selon plusieurs mécanismes originaux et complexes

Bien qu'ayant une région intracellulaire totalement distincte, l'isoforme moyenne de MUCDHL est capable comme les Cadhérines classiques d'interagir avec la β -caténine et d'inhiber son activité transcriptionnelle pro-oncogénique (Hinkel *et al.*, 2012). Dans le but de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu, et de localiser le domaine nécessaire à MUCDHL M pour interagir avec la β -caténine, nous avons généré une série de plasmides codant pour des protéines tronquées de MUCDHL M. Grâce à la délétion progressive de la partie intracellulaire de MUCDHL M, nous avons constaté que la région d'interaction des deux protéines est localisée au niveau du domaine cytoplasmique de MUCDHL M et qu'elle est juxta-membranaire. Néanmoins, l'étude d'une protéine tronquée de MUCDHL M dépourvue entièrement du domaine extracellulaire (M- Δ 466) a permis de mettre en évidence que le domaine intracellulaire seul de MUCDHL M ne suffit pas à lier la β -caténine, suggérant ainsi un rôle de la partie extracellulaire.

Afin de déterminer plus précisément les mécanismes d'inhibition de la β -caténine par MUCDHL M, nous avons comparé la capacité de liaison des différentes protéines tronquées avec leur impact sur l'activité transcriptionnelle de la β -caténine par un test luciférase spécifique. Les résultats obtenus ont montré que seule la protéine MUCDHL M dépourvue de partie extracellulaire (M- Δ 466) est incapable d'inhiber l'activité transcriptionnelle de la β -caténine. A l'inverse et de façon inattendue, des protéines tronquées de MUCDHL M comportant uniquement la partie extracellulaire (M-470) ou la partie extracellulaire suivie du domaine transmembranaire (M-500) sont capables d'inhiber la β -caténine, bien qu'elles n'interagissent pas avec cette dernière. Ces résultats indiquent que l'inhibition de l'activité pro-oncogénique de la β -caténine par MUCDHL M dépend de mécanismes complexes, ne

Résultats

reposant pas sur un simple mécanisme de séquestration membranaire de la β -caténine par MUCDHL M.

2.1 Le domaine intracellulaire de MUCDHL M interagit avec la β -caténine et inhibe son activité transcriptionnelle

Si nos résultats ont permis de montrer que l'interaction entre MUCDHL M et la β -caténine est une interaction intracellulaire, il est surprenant que la protéine tronquée codant le domaine intracellulaire et le domaine transmembranaire de MUCDHL M (M- Δ 466) ne soit pas capable d'interagir avec la β -caténine et d'inhiber son activité transcriptionnelle. Nous avons donc émis l'hypothèse, que l'absence d'interaction et d'inhibition soit due à un défaut de conformation de la protéine tronquée, lié à l'absence de la partie extracellulaire. De ce fait, nous avons généré deux protéines de fusion constituées de la région extracellulaire et transmembranaire du récepteur à l'Interleukine 2 et de la région intracellulaire de MUCDHL M complète (IL2r- Δ 500) ou tronquée au niveau de la zone riche en résidus Proline (IL2r-PRO). Ainsi, nos résultats indiquent que ces deux protéines chimériques co-immunoprécipitent avec la β -caténine, confirmant la zone d'interaction juxta-membranaire au niveau de MUCDHL M. Cependant, seule la protéine de fusion comprenant la totalité du domaine intracellulaire de MUCDHL M peut inhiber l'activité de la β -caténine. L'ensemble de nos résultats indiquent que la partie intracellulaire peut, si elle est correctement structurée, lier et inhiber la β -caténine. La présence de la séquence juxtamembranaire de MUCDHL M est suffisante pour la liaison de la β -caténine, mais pas pour l'inhibition de son activité transcriptionnelle qui requiert probablement la liaison de MUCDHL M à d'autres protéines.

2.2 Le domaine extracellulaire de MUCDHL M inhibe de manière indirecte l'activité transcriptionnelle de la β -caténine via une inhibition de l'EGFR

Afin d'expliquer comment les protéines MUCDHL M tronquées dépourvues de la partie intracellulaire parviennent à inhiber la β -caténine sans interagir avec cette dernière, nous avons émis l'hypothèse d'un mécanisme d'inhibition indirect. En effet, MUCDHL M pourrait interférer avec une autre voie de signalisation telle que celle du récepteur à l'EGF (EGFR).

Résultats

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons dans un premier temps mis en évidence une interaction entre l'EGFR et MUCDHL M, mais également entre l'EGFR et la partie extracellulaire seule de MUCDHL M (M-500). En revanche, les protéines tronquées et de fusion ne possédant pas de domaine extracellulaire de MUCDHL (M-Δ466 et IL2r-Δ500) ne se lient pas à l'EGFR, soulignant l'importance du domaine extracellulaire de MUCDHL M pour son interaction avec l'EGFR. Par la suite, nous avons vérifié, si l'inhibition de la β-caténine par les protéines totalement dépourvues de la partie intracellulaire de MUCDHL M passait par un mécanisme d'inhibition de la voie de l'EGFR. Ainsi, à l'aide de l'antagoniste AG1478, nous avons bloqué la voie de l'EGFR et analysé l'impact de différentes protéines tronquées de MUCDHL M sur l'inhibition de l'activité transcriptionnelle de la β-caténine. Comme attendu, en absence de traitement avec l'agoniste AG1478, MUCDHL M et son domaine extracellulaire seul inhibent l'activité de la β-caténine. En revanche, l'inhibition de l'EGFR par traitement avec l'antagoniste diminue significativement l'inhibition de la β-caténine par MUCDHL M et abolit complètement l'inhibition de la β-caténine par la région extracellulaire M-500. L'inhibition de l'activité transcriptionnelle de la β-caténine par MUCDHL M s'effectue donc selon plusieurs mécanismes, l'un d'entre eux étant un mécanisme d'inhibition indirect mettant en jeu le domaine extracellulaire de MUCDHL M et le récepteur à l'EGF.

Pour mieux comprendre ce mécanisme d'inhibition indirect dépendant de l'EGFR, nous avons étudié l'impact direct de MUCDHL M sur la voie de signalisation de l'EGFR, suite à l'activation de cette dernière par un traitement EGF. De manière intéressante, l'expression de MUCDHL M ou de son domaine extracellulaire (M-500) entraîne une diminution de la phosphorylation de l'EGFR, témoignant d'une baisse d'activation du récepteur à l'EGF. De plus, la phosphorylation de la protéine AKT est également diminuée dans ces conditions, reflétant une diminution de l'activation de la voie AKT. La voie AKT étant connue pour induire l'activité transcriptionnelle de la β-caténine via une inhibition de GSK3 par phosphorylation (Lee *et al.*, 2010), nous avons étudié la phosphorylation de GSK3. Les résultats obtenus indiquent une diminution de la phosphorylation de GSK3 en présence de MUCDHL M ou de son domaine extracellulaire, ce qui suggère une augmentation de l'activité de GSK3 et par conséquent une augmentation de la dégradation de la β-caténine. Ainsi, nous

Résultats

avons étudié la poly-ubiquitination et la dégradation de la β -caténine et nos résultats montrent une augmentation de la poly-ubiquitination et de la dégradation de la β -caténine en présence de MUCDHL M ou de son domaine extracellulaire. L'ensemble de ces résultats a permis de poser les bases d'un mécanisme d'inhibition indirect de la β -caténine par la partie extracellulaire de MUCDHL M, impliquant une interaction avec l'EGFR.

3. Les domaines extracellulaire et intracellulaire de MUCDHL M présentent une activité anti-tumorale

Les domaines extracellulaires et intracellulaires de MUCDHL M sont tous deux capables individuellement, d'inhiber l'activité transcriptionnelle de la β -caténine. Pour évaluer leur capacité à supprimer la formation de colonies (tests clonogéniques) ou la croissance sans ancrage, nous avons généré des lignées stables de cellules cancéreuses coliques (HCT116) exprimant de façon inductible la protéine de fusion IL2r- Δ 500, dépourvues de la région extracellulaire de MUCDHL M ; ou la protéine tronquée M-500, dépourvue de la région intracellulaire de MUCDHL M. Bien que moins efficaces que la protéine MUCDHL M complète, les deux types de protéines sont également capables de diminuer la formation de colonies sur plastique ou dans l'agar mou. Ces résultats suggèrent que les deux domaines contribuent individuellement à l'activité anti-tumorale de MUCDHL M.

II - Publication

The atypical cadherin MUCDHL antagonizes colon cancer and inhibits β -catenin signaling through multiple mechanisms

Short Title: Tumor suppressor activity of MUCDHL in the gut

MARINE BECK^{1#}, MATHILDE BARANGER^{1#}, AHLAM MOUFOK-SADOUN¹, EMILIE BERSUDER¹, ISABELLE HINKEL¹, GEORG MELLITZER¹, ELISABETH MARTIN¹, LAETITIA MARISA², ISABELLE DULUC¹, AURELIEN DE REYNIES², JEAN-NOEL FREUND¹ AND ISABELLE GROSS^{1*}

¹ Université de Strasbourg, Inserm, IRFAC UMR-S1113, Strasbourg 67200, France ; ² Ligue Nationale Contre le Cancer, Paris, France. # Equivalent contribution

Grant Support: supported by INSERM (2013-2019), by Fondation ARC (#SFI20101201854) and by La Ligue Contre Le Cancer (Haute-Marne 2013, Haut-Rhin 2016); MBs, EB, AMS, and IH were fellows of the French government (Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche). MBs were also fellows of Fondation ARC and EB of the FRM.

Abbreviations: aa (amino-acid); i.p. (intraperitoneal); KO (knock-out); RT (reverse transcription); qPCR (quantitative polymerase chain reaction); TM (transmembrane domain); WT (wild-type)

*** Correspondence:**

Isabelle Gross, INSERM UMR_S1113, 3 avenue Molière, 67200 Strasbourg, France

Tel: 33 388 27 53 66 Fax: 33 388 26 35 38 Email: Isabelle.Gross@inserm.fr

Disclosures: The authors have no conflicts of interest to disclose.

Author Contributions: IG and JNF designed the experiments; MBs, EB, AMS, IH, IG, GM, ID, EM, LM and AR performed the experiments; MBs, IG, AR, LM and JNF analyzed the data; IG and JNF provided funding; IG wrote the paper.

Abstract

Background & Aims: The cadherin-related gene *MUCDHL* (*CDHR5*) is highly expressed in the intestinal mucosa and drives brush border assembly through intermicrovillar adhesion. Reduced expression of *MUCDHL* has been reported in small cohorts of colorectal cancer patients and is believed to enhance WNT/ β -catenin signaling. The goal of this study was to establish and characterize the tumor suppressive activity of *MUCDHL*. **Methods:** Impact on tumorigenesis was studied using molecular and clinical features of human colon cancer biopsies (N~500), as well as a genetic mouse model of loss of function. Structure / function analyses were performed with co-immunoprecipitation, luciferase reporter gene, clonogenic and soft agar colony formation assays. **Results:** Diminished expression of *MUCDHL* in human colon tumors is associated with worse prognosis and decreased survival. Consistently, loss of *Mucdhl* expression in mice enhances tumor frequency and burden initiated by the loss of the tumor suppressor gene *Apc*. *MUCDHL* interacts with β -catenin through a juxta-membrane sequence of its cytoplasmic region but inhibit its transcriptional activity also by a binding-independent mechanism. The extracellular cadherin domain of *MUCDHL* binds to EGFR, thereby inhibiting its activity on AKT signaling and β -catenin stability. **Conclusions:** **This is the first report that shows that reduced expression of *MUCDHL* exacerbates tumorigenesis in the gut. In addition, it reveals that the mode of action of *MUCDHL* goes beyond membrane sequestration of β -catenin and targets other key oncogenic signaling pathways.**

Keywords: intestine; *CDHR5*; cadherin-related gene; *Apc*; EGFR

Introduction

Despite population-based screening and therapeutic progresses, colorectal cancer (CRC) remains one of the most common cause of cancer death in developed countries because of its high frequency, tumor recurrence and/or metastatic spread. Molecular characterization of tumors has led to the identification of numerous genes being mutated or dysregulated, but a clear appreciation of the functional significance of these alterations for the different steps of tumor progression is often lacking. Most colon tumors are sporadic adenocarcinoma that arise from successive transformations of the healthy epithelium towards adenoma, then carcinoma. Facing the potentially noxious content of the lumen, the single-layered epithelium of the colon is a selective barrier made of contiguous and polarized cells but also one of the most vigorously-renewing tissues in adults. Its turnover is fueled by self-renewing stem cells located at the bottom of the gland, which generate fast-cycling progenitors that progressively differentiate while migrating towards the mucosal surface {Gehart, 2019 #435}. Age, life style and/or inflammation are believed to jeopardize the intricate control mechanisms that allow the functional homeostasis of the colonic mucosa {Hughes, 2017 #436;Markowitz, 2002 #10}.

Sustaining stemness and cell proliferation, the canonical WNT/ β -catenin signaling pathway is essential for the renewal of the colonic epithelium and its abnormal activation is a hallmark of colon tumors that generally results from the loss of function of the tumor suppressor gene *APC* (*adenomatous polyposis coli*). Indeed, APC belongs to a degradation complex that controls cytoplasmic levels of β -catenin through N-terminal phosphorylation by GSK3 (glycogen synthase kinase 3) and poly-ubiquitination. Upon WNT signaling or genetic alteration (e.g. *APC*, *CTNNB1*), β -catenin is stabilized and able to accumulate in the

nucleus where it acts as a transcriptional co-activator for members of the TCF/ LEF (T cell factor/lymphoid enhancer factor) family of proteins resulting in the up-regulation of a large set of downstream genes {Novellasmunt, 2015 #388}. Constitutive activity of β -catenin in tumor cells translates into a crypt-progenitor cell-like phenotype that favors both tumor formation and progression.

Besides its transcriptional activity in the nucleus, β -catenin plays an important role in intercellular adhesion and thus is crucial for the barrier function of the colonic epithelium. Indeed, β -catenin is an essential part of adherens junctions, where it connects membranous E-cadherin (CDH1) to the actin cytoskeleton thereby enforcing the strength and stability of homophilic adhesion {Mege, 2017 #386}. Whether the binding of β -catenin to E-cadherin at the membrane interferes with its interactions with TCF/LEF transcription factors and impacts on transcriptional activity in the nucleus has been debated {Jeanes, 2008 #387}. Interestingly, a recent study provides in vivo evidence that E-cadherin can act as a buffer in intestinal cells, by sequestering stabilized β -catenin and limiting its transformation potential {Huels, 2015 #381}.

Similarly, other members of the cadherin superfamily that interact with β -catenin may be able to restrict its oncogenic activity in the colonic epithelium {van Roy, 2014 #365}. Namely, Losi and colleagues found a perfect correlation between the loss of MUCDHL (mucin and cadherin-like protein, CDHR5) and enhanced nuclear localization of β -catenin in a series of human colorectal tumors {Losi, 2011 #264}. Moreover, we have reported that the M isoform of MUCDHL binds to β -catenin and inhibits its transcriptional activity in human colon cancer cell lines {Hinkel, 2012 #209}. MUCDHL belongs to the heterogeneous family of cadherin-related proteins that are phylogenetically and structurally distinct from classical cadherins such as E-cadherin but display consecutive calcium-binding cadherin repeats (EC

repeats) in their extracellular region {Gul, 2017 #382}. The two splicing isoforms encoded by *MUCDHL* have only four EC repeats in their ectodomain, a single transmembrane domain and a cytoplasmic tail that shows no homology with any other cadherins but has four proline-rich motifs (PXXP) predicted to interact with SH3 domains and a PDZ binding motif (X-S/T-X-Φ) at its C-terminal extremity {Goldberg, 2002 #383}.

MUCDHL is primarily expressed in the intestinal epithelium and has attracted renewed attention for linking together apical microvilli on absorbent cells {Crawley, 2014 #270}. The consequences of this new function or of inhibiting β -catenin transcriptional activity for the homeostasis of the intestinal epithelium are yet unclear but reduced expression of *MUCDHL* was observed in pathological conditions such as CRC or inflammatory bowel diseases (IBD) {Bujko, 2015 #385;Hinkel, 2012 #209;Losi, 2011 #264}. In addition, we have shown that restoring its expression in colon cancer cells reduces tumor growth in nude mice {Hinkel, 2012 #209}. Here, we directly examined the consequences of reduced levels of *MUCDHL* for intestinal tumorigenesis using a large series of human colon tumors and genetically-invalidated *Mucdh1^{-/-}* mice. We also further investigated the molecular relationship between *MUCDHL* and β -catenin and uncovered an unexpected mode of action for *MUCDHL* fitting with its role in tumorigenesis. Taken together, our data provide evidence that *MUCDHL* has tumor suppressor activity in the gut and controls the transcriptional activity of β -catenin by multiple molecular mechanisms.

Materials and Methods

Bioinformatic Analyses of Human Colon Cancer Samples

The transcriptomic profiles recorded in GSE395821 {Marisa, 2013 #293} were analyzed. An independent two-group t test (function `t.test`, stats R package) was used to compare the

expression levels of *MUCDHL* between the C4 colon cancer subtype and the other subtypes (N=443). Comparison of the means for each subtype was performed using Tukey post hoc test after two-way ANOVA (function TukeyHSD, stats R package). Survival curves (N=557) were obtained according to the method of Kaplan and Meier (function Surv, R package survival), and differences between survival distributions were assessed by log-rank test.

Mice, Tumor Scoring and Immunohistochemistry

All animal procedures were carried out according to the protocol approved by the French Ministry of Agriculture under the permit number APAFiS #16115. *Mucdhl*^{+/+} and *Mucdhl*^{-/-} mice (B6;129S5-*Cdhr5*^{tm1Lex}/Mmucd) were obtained through homologous recombination targeting exon 1-7 of *Cdhr5* {Tang, 2010 #97} and provided by the MMRRRC (University of California, Davis, CA). Genotypes of all animals were verified by PCR (WT forward primer GCTATGTCTGCATTCATGCC and reverse primer GCACTGCTGGCCTCAGAGG: 398 bp; KO forward primer GCAGCGCATCGCCTTCTATC and reverse primer GCACTGCTGGCCTCAGAGG: 498 bp) and analyses were performed on littermates.

Apc^{Δ14/+}; *Mucdhl*^{+/+} and *Apc*^{Δ14/+}; *Mucdhl*^{-/-} compound animals were obtained by successive breeding with *Apc*^{Δ14/+} mice {Colnot, 2004 #39} provided by Christine Perret (Institut Cochin, Paris, France). Animals were regularly inspected for bleeding, anemia, and general behavior. Groups of male or female compound animals were sacrificed by cervical dislocation at 6-8 months when symptoms of neoplasia usually appeared. The whole intestinal tract of each mouse was removed, flushed with PBS, opened longitudinally, spread flat and fixed with 4% paraformaldehyde. Polyps' number, approximate size (microadenoma: 0.5-5 mm; macroadenoma: > 5 mm) and location were assessed under a dissecting microscope. As no difference was observed between male and female groups, all data were

pooled (with equivalent number of males and females of both genotypes) to increase statistical power.

1-2 tumors were fixed with 4% PFA, embedded in paraffin and sectioned (6 μ m) before staining with hematoxylin-eosin (HE) or processing for immunohistochemistry as described {Benahmed, 2007 #3} using anti-MUCDHL (H-225, 1/500; Santa Cruz Biotechnology), anti- β -catenin (clone 14, 1/500; BD Biosciences) or anti-CDX2 (clone EPR2764Y, 1/10000; Thermo Fisher Scientific). Secondary biotinylated antibodies (1/2000; Vector Laboratories) were revealed using the Vectastain ABC kit (Vector Laboratories). For immunofluorescence detection, secondary goat anti-rabbit antibody labeled with Alexa Fluor 488 or goat anti-mouse antibody labeled with Alexa Fluor 568 (1/1000; Molecular Probes) were used. Sections were visualized with an Axiophot microscope or an Axio Imager Z2 microscope (Zeiss).

Cell Lines

Caco-2/TC7 cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle medium (Invitrogen, Carlsbad, CA) supplemented with 20% heat-inactivated fetal bovine serum (Invitrogen), 1% non-essential amino acids, and antibiotics. Human embryonic kidney HEK293 (American Type Culture Collection) were grown in Dulbecco's modified Eagle medium supplemented with 10% fetal bovine serum and antibiotics.

The T-REx™ System (Invitrogen) was used to establish MUCDHL-inducible cell lines. Clone 7 of HCT116TR cells {Hinkel, 2012 #209}, which constitutively express the tetracycline repressor, was transfected with pcDNA4/TO-M- Δ 466/HA, pcDNA4/TO- IL2r- Δ 500/HA or pcDNA4/TO-M-500/HA (see below) and submitted to Zeocin selection. Several independent stable clones expressing HA-tagged M- Δ 466, IL2r- Δ 500 or M-500 were obtained. These

clones were maintained in DMEM supplemented with 10% FBS, Blastidicin (4 µg/ml, Invitrogen), Zeocin (100 µg/ml, Invitrogen) and antibiotics. Induction of expression was performed by adding doxycycline (1 µg/ml, Sigma, Saint Louis, MO) to the medium.

Plasmids

pRL-null was from Promega (Madison, WI) and pEGFP-C1 from Clontech Laboratories, Inc (Mountain View, CA). pcDNA4/TO was from Invitrogen. pTopFlash, pFopFlash, pcDNA1 expressing Myc-tagged TCF4, and pCI-Neo expressing human beta-catenin S33Y were from H. Clevers (Utrecht University Medical Center, Utrecht, The Netherlands). EGFR-GFP and pcDNA3 expressing Flag-tagged human-catenin WT or S33Y were from Addgene (Cambridge, MA; #32751, #16828, and #19286, {Kolligs, 1999 #47}).

pcDNA4/TO-DHLM/HA that allows inducible expression of C-terminally HA-tagged full-length human MUCDHL M (NP_112554.2) was described {Hinkel, 2012 #209}. cDNAs encoding truncated versions of MUCDHL M were generated by PCR (Platinum® Pfx Polymerase, Invitrogen) using pcDNA4/TO-DHLM/HA as template, a common forward primer IFALL-DHLM-F and a specific reverse primer IF(AA STOP)-DHLM-R (AA corresponds to the aa replaced by a STOP codon) and sub-cloned into *XbaI-KpnI*-linearized pcDNA4/TO using the In-Fusion® HD Cloning kit (Clontech Laboratories, Inc) to generate pcDNA4/TO-M-648/HA, pcDNA4/TO-M-598/HA, pcDNA4/TO-M-572/HA, pcDNA4/TO-M-548/HA, pcDNA4/TO-M-524/HA, pcDNA4/TO-M-500/HA and pcDNA4/TO-M-470/HA. pcDNA4/TO-M-Δ466/HA was generated in 2 steps: first, a cDNA was produced by PCR (template: pcDNA4/TO-DHLM/HA; primers: E47DHL466F and X-DHLR) and inserted in the shuttle vector pCR®II TOPO (Invitrogen) to create TOPO-DHL466E47X; next, a PCR fragment (template: pcDNA4/TO-

DHLM/HA; primers H-DHLPSF and E47-DHLPSR) encoding the signal peptide of MUCDHL M was sub-cloned in frame into TOPO-DHL466E47X using *HindIII* and *E47III* restriction sites to generate pcDNA4/TO-M-Δ466/HA.

PCR fragments corresponding to the extracellular and transmembrane domains of IL2R (template: IL2r/hE-cadherin-cytotal, #45773 from Addgene; primers: F-A and R-C) and C-terminal regions of MUCDHL (template: pcDNA4/TO-DHLM/HA or pcDNA4/TO-M-572/HA; primers: F-D and R-E) were combined into *BamHI-XhoI*-linearized pcDNA4/TO with the In-Fusion® HD Cloning kit to generate IL2r-Δ500 and IL2r-PRO.

Each new construct was checked by sequencing (GATC Biotech, Konstanz, Germany) and sequences of primers are available upon request.

Transfections

Plasmid transfections were performed as recommended with Jetprime (Polyplus Transfection) for protein assays and with JetPEI (Polyplus Transfection) for Luciferase assays.

Luciferase Assays

Luciferase assays were performed with the Dual-Luciferase Reporter Assay (Promega) as described {Hinkel, 2012 #209}. EGFR signaling was blocked 24 hrs before lysis with AG1478 (20 μM; Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY).

Colony Formation Assays and Soft Agar Assays

For colony formation assays, 250 cells in 1 ml of medium were added to 1 ml of medium without or with doxycycline (2 μg/ml) in a well of a 6-well plate (3 replicates) and

allowed to grow for 14 days before fixation (70% Ethanol), staining with Crystal violet (0.05% in PBS) and counting of the colonies.

For soft agar assays, cells were mixed with DMEM containing 10% FBS and 0.4% low melting point agarose (Promega). 1.5 ml of this solution (containing 5000 cells) were added to each well of a 6-well plate previously coated with 1.5 ml of 0.6% low melting agarose (3 replicates). After 30 min, 1 ml of growth medium without or with doxycycline (1 μ g/ml) was added to each well. Medium was changed every 2-3 days. After 2 weeks, colonies were fixed, stained and counted.

Immunoprecipitation, Ubiquitination and Stability Assays

Cells were treated overnight with MG132 (10 μ M, Sigma) for most experiments including β -catenin and serum-deprived (0% FBS) overnight only when stimulated by EGF (30 ng/ml for 4 min, Sigma). For co-immunoprecipitations assays, lysis was performed with cold 2% NP40 – 150 mmol/L NaCl – 50 mmol/L-Tris pH 7.5 lysis buffer containing protease inhibitors (Complete; Roche Applied Science, Germany) and phosphatase inhibitors (Cocktail II & III, Sigma). For co-immunoprecipitations of HA-tagged MUCDHL, 1 mg of cellular extract was incubated 2 hrs at 4°C with 30 μ L of anti-HA affinity matrix (Roche) and beads were washed afterwards 3-4 times for 10 min with lysis buffer. For co-immunoprecipitations of endogenous MUCDHL, 3 mg of cellular extract were incubated overnight at 4°C with 1 μ g of a goat anti-MUCDHL antibody (R&D Systems, Minneapolis, MN) or goat Ig (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), and 30 μ L of protein G-Agarose beads (Roche) were added the last 45 min. Beads were next washed 4 times for 10 min with lysis buffer adjusted to 500 mmol/L NaCl. In both cases, beads were finally resuspended in 20 μ L of Laemmli loading

buffer (Bio-Rad, Hercules, CA), and boiled for 5 min before SDS-PAGE.

For ubiquitination assays, cells were lysed in RIPA lysis buffer (1% NP40 - 150 mmol/L NaCl - 50 mmol/L - Tris pH 7.5 - 0.5% Deoxycholate - 0.1% SDS) and sonicated for 5 min (Bioruptor UCD-200, Diagenode, Liege, Belgium). Immunoprecipitation was performed as detailed above on 1 mg of MG132-treated cells, either with 1 µg of a mouse anti-β-catenin antibody (clone 14; BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) or mouse IgG (Santa Cruz Biotechnology), with beads being washed two times in lysis buffer and 3 times in lysis buffer adjusted to 500 mmol/L NaCl.

For stability assays, cells were not treated with MG132 but with cycloheximide (100 µg/ml, Calbiochem, Darmstadt, Germany) for different times before lysis in NP-40 buffer.

Western Blot

Western blot analysis was performed as described {Gross, 2008 #79} with one of the following primary antibodies: β-catenin (clone 14, 1/5000; BD Biosciences,), MUCDHL (H-225, 1/5000; Santa Cruz Biotechnology), MUCDHL (C-20, 1/5000; Santa Cruz Biotechnology), HA (clone 3F10, 1/5000; Roche), P-EGFR (Tyr 1068, clone D7A5, 1/1000; Cell Signaling Technology Danvers, MA), EGFR (clone D38B1, 1/1000; Cell Signaling Technology), P-AKT (Ser 473, clone D9E, 1/1000; Cell Signaling Technology), AKT (1/1000; Cell Signaling Technology), P-GSK-3β (Ser 9, clone D85E12, 1/1000; Cell Signaling Technology), GSK3β (clone D5C5Z, 1/1000; Cell Signaling Technology), FLAG (M2, 1/1000; Sigma), Ub (P4D1, 1/1000; Santa Cruz Biotechnology) and Actin (1/15000; EMD Millipore, Billerica, MA). Secondary antibodies (ECL Mouse or Rabbit IgG HRP-linked whole Ab, Amersham) were diluted at 1/10000 (ECL,

Amersham) or 1/50000 (ECL Prime, Amersham). Signals were quantified either with Image J or a PXL imaging system (Syngene, Bangalore, India).

Statistical Analyses

Student's t test was used to compare 2 experimental conditions and a 1-way analysis of variance (ANOVA) test followed by a Tuckey post-test was used to compare more experimental conditions.

Results

Low level of MUCDHL Expression Correlates with Reduced Survival of Colon Cancer

Patients

To substantiate the implication of *MUCDHL* in colon carcinogenesis that was suggested by former studies {Bujko, 2015 #385;Hinkel, 2012 #209;Losi, 2011 #264}, we first examined *MUCDHL* expression in a large and well-characterized collection of human colon tumors (N>500 tumors, {Marisa, 2013 #293}). Extending previous observations made on smaller cohorts (N<30), we found that *MUCDHL* mRNA expression is reduced in most tumor samples (Figure 1A). Interestingly, we noticed that this decrease was the most pronounced in the C4 molecular subtype (C4 versus others, p-value = 9.9×10^{-9}) characterized by a cancer stem cell signature, a poor survival {Marisa, 2013 #293} and associated with the CMS4 type in the consensus classification {Guinney, 2015 #437}. In addition, when we specifically compared patients' outcome according to *MUCDHL* expression level within their tumor, we found that those expressing it the less exhibit reduced survival (-15% and -25% over 5 and 10

years respectively, Figure 1B). Altogether, these data suggest that the decrease of *MUCDHL* expression is an adverse event in colon cancer.

Loss of Mucdhl Expression in Mice Enhances Intestinal Tumorigenesis

To experimentally address the impact of the loss of MUCDHL on gut tumorigenesis, we took advantage of mice exhibiting homozygous invalidation of *Mucdhl* {Tang, 2010 #97}. An initial survey did not reveal any difference in spontaneous tumor incidence between wild-type (*Mucdh^{+/+}*) and knock-out (*Mucdhl^{-/-}*) mice, even in old animals (~ 20 months, data not shown). Histological examination of the intestine of *Mucdhl^{-/-}* mice indicated that the overall architecture of their mucosa was maintained (Supplementary Figure 1A), although a slight increase in cellular proliferation was noticed in absence of MUCDHL (BrdU labeling, Supplementary Figure 1B).

As the loss of MUCDHL expression did not initiate tumorigenesis on its own, we examined its impact in the tumor-prone model resulting from the loss of *Apc*. For this, we crossed *Mucdhl^{+/+}* and *Mucdhl^{-/-}* mice with *Apc^{Δ14/+}* mice, which spontaneously develop intestinal adenoma {Colnot, 2004 #39}, to generate *Apc^{Δ14/+}; Mucdhl^{+/+}* and *Apc^{Δ14/+}; Mucdhl^{-/-}* compound animals. In this context, the loss of MUCDHL enhanced tumor incidence and multiplicity. Indeed, the proportion of mice showing intestinal tumors was higher in *Apc^{Δ14/+}; Mucdhl^{-/-}* mice compared to *Apc^{Δ14/+}; Mucdhl^{+/+}* mice (Figure 2A, 83% vs 56% of mice). *Apc^{Δ14/+}; Mucdhl^{-/-}* mice also had more tumors (Figure 2B-C), especially the large ones (Figure 2D-E), than *Apc^{Δ14/+}; Mucdhl^{+/+}* mice.

Through histological analyses, we did not notice any obvious difference (Figure 2F, Supplementary Figure 1C) between tumors of *Apc^{Δ14/+}; Mucdhl^{-/-}* and *Apc^{Δ14/+}; Mucdhl^{+/+}*

mice regarding grade (heterogeneous levels of differentiation) or aggressiveness (no local invasion, no liver metastases). β -catenin exhibited a heterogeneous cytoplasmic / nuclear pattern in tumors of both genotypes (Figure 2F). As expected MUCDHL expression was absent throughout the intestinal tissue of *Apc* ^{Δ 14/+}; *Mucdhl*^{-/-} mice, but it was already strongly reduced in the tumor area of *Apc* ^{Δ 14/+}; *Mucdhl*^{+/+} animals. Interestingly, malignant cells that had lower MUCDHL expression often had also reduced levels of CDX2 and membranous to cytoplasmic / nuclear translocation of β -catenin (Figure 2F).

Taken together these results indicate that the loss of *Mucdhl* in mice contributes to intestinal carcinogenesis by enhancing intestinal tumor frequency and growth.

Functional Mapping of the MUCDHL/ β -Catenin Interaction Reveals Multiple Mechanisms of Inhibition

Given that MUCDHL deficiency stimulates WNT/ β -catenin-dependent tumorigenesis, we focused our investigation of the mechanisms involved in its anti-tumor activity on β -catenin. Indeed, this critical effector of the pathway was previously shown to interact with MUCDHL M in colon cancer cell lines {Hinkel, 2012 #209; Losi, 2011 #264} but many aspects of this interaction remain unclear. The first issue investigated here was the exact sub-cellular localization of β -catenin and MUCDHL in the intestinal epithelium using immunofluorescence on human tissue sections. As reported by others {Crawley, 2014 #270; Huels, 2015 #381} and shown on Figure 3A, MUCDHL is mostly localized at the brush border and β -catenin at the lateral side of absorptive cells. However, we were able to observe a partial co-localization of both proteins as MUCDHL is also detected at the lateral

membrane below the brush border. This observation therefore confirms and refines our previous in situ proximal ligation assay (PLA) data {Hinkel, 2012 #209}.

The second issue concerns the mechanism by which MUCDHL M inhibits the transcriptional activity of β -catenin and was addressed by performing an in-depth structure-function analysis. MUCDHL M is a type I transmembrane protein with a large extracellular domain (aa 1-473), a single-spanning transmembrane (TM) domain (aa 474-496) and a short cytoplasmic tail (aa 497-651). We generated a series of truncated MUCDHL M proteins (Figure 3B) to map the domain involved in the binding to β -catenin {Hinkel, 2012 #209}. All truncated MUCDHL proteins exhibited the expected size and were correctly addressed at the membrane, like the full-length protein (Supplementary Figures 2 & 3). As illustrated on Figure 3C, progressive deletion of the cytoplasmic tail indicated that **i)** deleting the 103 aa of the 151 aa cytoplasmic tail (M-548), which enclose the SH3 binding motifs and the PDZ binding motif {Goldberg, 2002 #383}, did not change the co-immunoprecipitation of MUCDHL M with β -catenin in HEK293 cells, **ii)** cutting off the next 24 aa compromised it (M-524) and **iii)** removing the last cytoplasmic 24 aa abolished it (M-500). This suggests that the intracellular region of MUCDHL M in close vicinity to the membrane (aa 500-548) is required for the interaction with β -catenin. However, we unexpectedly observed that a MUCDHL M form deleted of its extracellular domain but still having intact TM and cytoplasmic domains (M- Δ 466) was unable to co-immunoprecipitate with β -catenin (Figure 3C). To test if this lack of binding resulted from an inappropriate conformation of the cytoplasmic tail normally dictated by the extracellular domain in the full-length protein, we opted for a strategy of fusion proteins that was previously used for other cadherins, namely E-cadherin {Gottardi, 2001 #379}. We generated chimeric proteins in which the extracellular and TM domains of the interleukin 2 receptor alpha (IL2r) are fused to either the complete intracellular region of

MUCDHL or only the 75 aa following the TM domain (respectively IL2r- Δ 500 and IL2r-PRO, Figure 3A). As shown on Figure 3D, both fusion proteins were able to co-immunoprecipitate with β -catenin. Altogether, these data indicate that the cytoplasmic segment of MUCDHL M close to the membrane mediates the interaction with β -catenin but that efficient binding requires a correct conformation depending on the presence of an extracellular domain, even heterologous.

Having displayed the requirements for the molecular interaction of MUCDHL M with β -catenin, we then compared the inhibitory capacity of the various recombinant forms of MUDHL on β -catenin transcriptional activity using the TopFlash luciferase reporter assay {Korinek, 1997 #5} in HEK293 cells (Figure 3E). As expected, all the truncated forms able to interact with β -catenin were also capable of reducing the TopFlash reporter activity. Moreover, the fusion protein containing the complete cytoplasmic tail of MUCDHL M (IL2r- Δ 500) was almost as efficient as MUCDHL M in diminishing β -catenin activity (Figure 3F). Thus, if appropriately structured by an extracellular domain, the cytoplasmic tail is able to inhibit the transcriptional activity of β -catenin.

Unexpectedly, the luciferase measurements also revealed that MUCDHL M forms lacking the cytoplasmic tail but having the extracellular domain (M-500 and M-470) were also able to specifically reduce β -catenin transcriptional activity (Figure 3F) although they did not co-immunoprecipitate with β -catenin (Figure 3C, Supplementary Figure 4). Thus, taken together these structure-function results indicate that MUCDHL M does not only inhibit β -catenin by membrane sequestration but also by a binding-independent mechanism.

The Extracellular Domain of MUCDHL M is Able to Oppose β -Catenin Through EGFR

Inhibition

We investigated the molecular mechanism by which the extracellular domain of MUCDHL M was able to inhibit the transcriptional activity of β -catenin. We assumed the existence of an indirect mechanism whereby MUCDHL M would interfere with a signaling pathway. This hypothesis is supported by the fact that cadherins can bind to other types of membrane proteins, such as integrins or tyrosine kinase receptors {van Roy, 2014 #365}. One attractive candidate for MUCDHL M is the epithelial growth factor receptor (EGFR) that has been connected to both cadherins and β -catenin signaling {Hu, 2010 #395;van Roy, 2014 #365}.

First, we verified if endogenous MUCDHL and EGFR can interact in differentiated intestinal cells. Indeed, EGFR did co-immunoprecipitate with MUCDHL in Caco2 cells (Figure 4A). Similarly, both proteins co-immunoprecipitated in transfected HEK293 cells (Figure 4B). Co-immunoprecipitation was also observed with MUCDHL M proteins lacking the cytoplasmic domain (M-500) but not with the ones missing its extracellular domain (M- Δ 466 and IL2r- Δ 500). Thus, the extracellular domain of MUCDHL M was both necessary and sufficient for its interaction with EGFR.

Then, we functionally investigated if the ability of the extracellular domain of MUCDHL M to reduce the transcriptional activity of β -catenin was dependent on EGFR signaling using the selective inhibitor AG1478. In control conditions, both full-length MUCDHL M (M-FL) and its extracellular domain (M-500) were able to significantly reduce the transcriptional activity of β -catenin (Figure 4C). In contrast, when EGFR signaling was blocked by AG1478, this inhibitory effect was reduced by nearly two-fold for the full-length

protein and abolished for the extracellular domain (Figure 4C). Thus, the extracellular domain of MUCDHL M participates in the inhibition of β -catenin not only by allowing the intracellular tail to adopt a conformation compatible with interaction and sequestration, but also indirectly by interfering with EGFR signaling.

Finally, we examined the functional impact of MUCDHL M on EGFR activation and signaling. Phosphorylation of EGFR upon EGF treatment was decreased in the presence of MUCDHL M, indicating weaker activation of the receptor (Figure 4D). Accordingly, activation of AKT upon EGF treatment was diminished in the presence of MUCDHL (Figure 4D). Of note, similar effects on EGFR and AKT phosphorylation were observed with the MUCDHL M form truncated from its cytoplasmic tail (M-500), demonstrating that the inhibition of EGFR signaling is depending on the extracellular domain of MUCDHL. As AKT is known to enhance the transcriptional activity of β -catenin through inhibition of GSK-3 {Manning, 2007 #428;McCubrey, 2014 #427}, we also checked the phosphorylation status of this kinase. As shown on Figure 4D, phosphorylation of GSK-3 β at Serine 9 was indeed lower in the presence of MUCDHL M, either full-length (M-FL) or truncated of its cytoplasmic tail (M-500), suggesting higher GSK-3 activity and increased β -catenin degradation. Corroborating this hypothesis, the presence of full-length MUCDHL M led to robust polyubiquitination and decreased stability of β -catenin (Figure 5A, B). Furthermore, similar results were obtained with the MUCDHL M form lacking the cytoplasmic domain (M-500) but not with the one in which the extracellular domain was swapped with the extracellular domain of ILr2 (IL2r- Δ 500). Altogether these results display an original mechanism whereby the extracellular domain of MUCDHL M is able to inhibit the transcriptional activity of β -catenin by interfering with the EGFR-mediated control of its stability.

Both Intracellular and Extracellular Domains Of MUCDHL Have Anti-Tumor Potential

Because both the intracellular and the extracellular domains of MUCDHL M are able to independently inhibit transcriptional activity of β -catenin, we tested their functional impact on tumor cells using clonogenic and soft-agar colony formation assays. For this, we established stable colon cancer HCT116 cell lines expressing different domains of MUCDHL M upon doxycycline treatment (Supplementary Figure 5) as previously done for the full-length protein {Hinkel, 2012 #209}. As expected, expression of full-length MUCDHL M (M FL-33 clone) reduced colony formation in both assays, while expression of only its cytoplasmic tail (M Δ 466-x clones) had no effect (Figure 6A, D). However, when the cytoplasmic tail was expressed as a fusion protein with IL2r to restore the ability to interact with β -catenin (IL2r Δ 500-x clones), it lowered the number of colonies in both tests (Figure 6B, E). Likewise, expression of MUCDHL M without cytoplasmic tail (M 500-x clones) reduced the clonogenic potential and the soft-agar growth of HCT116 cells (Figure 6C, F). Interestingly, the impact of each of these truncated forms of MUCDHL M was weaker than the one observed upon expression of the full-length protein, suggesting that both regions are contributing to the anti-tumor activity of MUCDHL M in vitro, as anchorage-independent growth is a hallmark of malignant transformation {Borowicz, 2014 #430}.

Discussion

The cadherin superfamily encompasses over 100 members showing great diversity in structure and function. In contrast to E-cadherin, the archetype of classical cadherins, atypical members of the superfamily have been poorly studied. Here, we focused on

MUCDHL, a cadherin-related gene identified nearly 20 years ago, which has recently attracted renewed attention for its role in intestinal brush border assembly and its dysregulation in various intestinal diseases.

Although previous reports suggested a connection between *MUCDHL* and colon cancer, the combination of data from a large, extensively-characterized, multicenter series of colon cancer samples {Marisa, 2013 #293} with those of a genetically-invalidated mouse model allowed us to make firmer conclusions and brought new information. While establishing on a much wider scale that *MUCDHL* expression is reduced in most human colon tumors, we also found that the level of its decrease depends on the molecular subtype of the tumor. Indeed, *MUCDHL* expression is particularly diminished in the C2 and C5 subtype, and even more in the C4 subtype. As these subtypes show dysregulated CDX2 (C2 and C4 {Balbinot, 2018 #425}) or β -catenin (C5 {Marisa, 2013 #293}), which both control *MUCDHL* expression {Hinkel, 2012 #209;Montorsi, 2016 #389}, this suggests that, similarly to E-cadherin, decreased expression of *MUCDHL* in colon tumors is not only caused by hypermethylation of its promoter {Bujko, 2015 #385} but also by altered transcriptional regulation. Similarly, we found that tumors cells of *Apc* ^{$\Delta 14/+$} mice lacking *MUCDHL* expression had also lower expression of CDX2 and increased nuclear translocation of β -catenin. Another characteristic of the C4 subtype is its correlation with poorer outcome and classification of its tumors as “high risk” by the Oncotype DX recurrence score {O'Connell, 2010 #394}. Accordingly, we showed for the first time that reduced expression of *MUCDHL* has physiopathological consequences as it aggravates intestinal tumorigenesis both in human (decreased survival) and mice (incidence and burden).

The tumors formed in absence of *Mucdhl* in mice were not different from an anatomopathological perspective, but were more frequent and often larger. Thus, even if not sufficient *per se* to initiate tumorigenesis, it is likely that the loss of *MUCDHL* favors early steps of tumor formation and growth rather than tumor progression. In agreement with this hypothesis, Bujko et al also reported a stepwise downregulation of *MUCDHL* expression in CRC that was already significant at early stages of tumorigenesis {Bujko, 2015 #385}. While the loss of differentiation markers and adhesion molecules during tumor progression is thought to facilitate the metastatic process, its consequences at the early phase of tumor formation are more controversial. However, epithelial features such as apico-basal polarity or adhesion are mechanistically connected to cell proliferation and survival {Martin-Belmonte, 2012 #299}. Furthermore, the validity of a “top-down” model of adenoma formation {Shih, 2001 #391} through dedifferentiation of intestinal cells was experimentally proven in mice {Schwitalla, 2013 #268} and supported by histopathological observation of human tumors (references within {Shih, 2001 #391}).

Concerning *MUCDHL*, many questions about the cellular mechanisms involved in its tumor suppressor activity are still open. *MUCDHL* is mainly detected at the brush border where it mediates microvillar adhesion {Crawley, 2014 #270}. Loss of *MUCDHL* at the apex of colonocytes may impair the protective barrier formed by tightly-packed microvilli or alter cellular polarity as reported for the brush border protein MYO1A {Mazzolini, 2012 #267}. On the other hand, besides the prominent localization at the brush border of mature absorbent cells, we and others detected *MUCDHL* at intercellular junctions, especially in differentiating cells {Moulton, 2004 #35} where it may contribute to the progressive decline of the WNT/ β -catenin signaling required to slow down proliferation along the villus. In line with this hypothesis, we observed that the loss of *MUCDHL* correlated with a slight increase of cell

proliferation in the murine intestinal epithelium. However, no obvious difference in cell proliferation was detected between *Apc*^{Δ14/+}; *Mucdhl*^{+/+} and *Apc*^{Δ14/+}; *Mucdhl*^{-/-} tumors (Supplementary Figure 1C) probably reflecting the time lag between the loss of MUCDHL in early steps of carcinogenesis and the detection of tumors in the *Apc*^{Δ14/+} model. Thus, the use of conditional mouse models that allow a better control of the carcinogenic process will help to investigate in vivo the consequences of MUCDHL deficiency in tumors.

Nevertheless, the present study revealed novel and unexpected information about the functional relationship between MUCDHL M and β-catenin. Indeed, unlike the classic E-cadherin that binds β-catenin through the end of its cytoplasmic tail, MUCDHL M requires amino-acids located just after its transmembrane segment for its molecular interaction with β-catenin. Furthermore, we found quite unexpectedly that this cytoplasmic region of MUCDHL M was sufficient but not necessary for inhibiting the transcriptional activity of β-catenin and colony formation. In fact, we showed that MUCDHL M is also active independently of its binding to β-catenin and is able through its extracellular domain to decrease the stability of β-catenin. Altogether our data are consistent with an indirect mechanism where MUCDHL is reducing AKT activity downstream of EGFR signaling and thereby is alleviating its inhibitory effect on GSK3 activity that allows polyubiquitination and degradation of β-catenin. Given that EGFR and AKT signaling pathways are both pro-oncogenic in colon cancer cells {Danielsen, 2015 #392;Fichera, 2007 #393} and affect cellular processes such as proliferation and survival, these findings imply that tumor suppression by MUCDHL goes well beyond β-catenin sequestration and warrant future investigations.

In summary, we provided here evidence that the decreased expression of *MUCDHL* in transformed colon cells is an adverse event that goes beyond the loss of a differentiation

marker and contributes to the deregulation of key oncogenic signaling pathways. Thus, the decline of MUCDHL displayed here in a large proportion of human colon cancers is highly meaningful.

Acknowledgments

We thank Drs. C. Perret, M. Rousset, H. Clevers, E. Fearon, A. Sorkin, B. Gumbiner for reagents, and C. Gaidon for critical reading of the manuscript.

References

1. Gehart H, Clevers H. Tales from the crypt: new insights into intestinal stem cells. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2019;16:19-34.
2. Hughes LAE, Simons C, van den Brandt PA, et al. Lifestyle, Diet, and Colorectal Cancer Risk According to (Epi)genetic Instability: Current Evidence and Future Directions of Molecular Pathological Epidemiology. *Curr Colorectal Cancer Rep* 2017;13:455-469.
3. Markowitz SD, Dawson DM, Willis J, et al. Focus on colon cancer. *Cancer Cell* 2002;1:233-6.
4. Novellasademunt L, Antas P, Li VS. Targeting Wnt signaling in colorectal cancer. A Review in the Theme: Cell Signaling: Proteins, Pathways and Mechanisms. *Am J Physiol Cell Physiol* 2015;309:C511-21.
5. Mege RM, Ishiyama N. Integration of Cadherin Adhesion and Cytoskeleton at Adherens Junctions. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2017;9.
6. Jeanes A, Gottardi CJ, Yap AS. Cadherins and cancer: how does cadherin dysfunction promote tumor progression? *Oncogene* 2008;27:6920-9.
7. Huels DJ, Ridgway RA, Radulescu S, et al. E-cadherin can limit the transforming properties of activating beta-catenin mutations. *EMBO J* 2015;34:2321-33.
8. van Roy F. Beyond E-cadherin: roles of other cadherin superfamily members in cancer. *Nat Rev Cancer* 2014;14:121-34.
9. Losi L, Parenti S, Ferrarini F, et al. Down-regulation of mu-protocadherin expression is a common event in colorectal carcinogenesis. *Hum Pathol* 2011;42:960-71.
10. Hinkel I, Duluc I, Martin E, et al. Cdx2 controls expression of the protocadherin Mucdhl, an inhibitor of growth and beta-catenin activity in colon cancer cells. *Gastroenterology* 2012;142:875-885 e3.
11. Gul IS, Hulpiau P, Saeys Y, et al. Evolution and diversity of cadherins and catenins. *Exp Cell Res* 2017.

12. Goldberg M, Wei M, Tycko B, et al. Identification and expression analysis of the human mu-protocadherin gene in fetal and adult kidneys. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002;283:F454-63.
13. Crawley SW, Shifrin DA, Jr., Grega-Larson NE, et al. Intestinal brush border assembly driven by protocadherin-based intermicrovillar adhesion. *Cell* 2014;157:433-46.
14. Bujko M, Kober P, Statkiewicz M, et al. Epigenetic-Mediated Downregulation of mu-Protocadherin in Colorectal Tumours. *Gastroenterol Res Pract* 2015;2015:317093.
15. Marisa L, de Reynies A, Duval A, et al. Gene expression classification of colon cancer into molecular subtypes: characterization, validation, and prognostic value. *PLoS Med* 2013;10:e1001453.
16. Tang T, Li L, Tang J, et al. A mouse knockout library for secreted and transmembrane proteins. *Nat Biotechnol* 2010;28:749-55.
17. Colnot S, Niwa-Kawakita M, Hamard G, et al. Colorectal cancers in a new mouse model of familial adenomatous polyposis: influence of genetic and environmental modifiers. *Lab Invest* 2004;84:1619-30.
18. Benahmed F, Gross I, Guenot D, et al. The microenvironment controls CDX2 homeobox gene expression in colorectal cancer cells. *Am J Pathol* 2007;170:733-44.
19. Kolligs FT, Hu G, Dang CV, et al. Neoplastic transformation of RK3E by mutant beta-catenin requires deregulation of Tcf/Lef transcription but not activation of c-myc expression. *Mol Cell Biol* 1999;19:5696-706.
20. 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;27:107-15.
21. Guinney J, Dienstmann R, Wang X, et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med* 2015;21:1350-6.
22. Gottardi CJ, Wong E, Gumbiner BM. E-cadherin suppresses cellular transformation by inhibiting beta-catenin signaling in an adhesion-independent manner. *J Cell Biol* 2001;153:1049-60.
23. Korinek V, Barker N, Morin PJ, et al. Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC^{-/-} colon carcinoma. *Science* 1997;275:1784-7.
24. Beck F, Stringer EJ. The role of Cdx genes in the gut and in axial development. *Biochem Soc Trans* 2010;38:353-7.
25. Manning BD, Cantley LC. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* 2007;129:1261-74.
26. McCubrey JA, Steelman LS, Bertrand FE, et al. GSK-3 as potential target for therapeutic intervention in cancer. *Oncotarget* 2014;5:2881-911.
27. Borowicz S, Van Scoyk M, Avasarala S, et al. The soft agar colony formation assay. *J Vis Exp* 2014:e51998.
28. Balbinot C, Armant O, Elarouci N, et al. The Cdx2 homeobox gene suppresses intestinal tumorigenesis through non-cell-autonomous mechanisms. *J Exp Med* 2018;215:911-926.
29. Montorsi L, Parenti S, Losi L, et al. Expression of mu-protocadherin is negatively regulated by the activation of the beta-catenin signaling pathway in normal and cancer colorectal enterocytes. *Cell Death Dis* 2016;7:e2263.
30. O'Connell MJ, Lavery I, Yothers G, et al. Relationship between tumor gene expression and recurrence in four independent studies of patients with stage II/III colon cancer

- treated with surgery alone or surgery plus adjuvant fluorouracil plus leucovorin. *J Clin Oncol* 2010;28:3937-44.
31. Martin-Belmonte F, Perez-Moreno M. Epithelial cell polarity, stem cells and cancer. *Nat Rev Cancer* 2012;12:23-38.
 32. Shih IM, Wang TL, Traverso G, et al. Top-down morphogenesis of colorectal tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:2640-5.
 33. Schwitalla S, Fingerle AA, Cammareri P, et al. Intestinal tumorigenesis initiated by dedifferentiation and acquisition of stem-cell-like properties. *Cell* 2013;152:25-38.
 34. Mazzolini R, Dopeso H, Mateo-Lozano S, et al. Brush border myosin Ia has tumor suppressor activity in the intestine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109:1530-5.
 35. Moulton DE, Crandall W, Lakhani R, et al. Expression of a novel cadherin in the mouse and human intestine. *Pediatr Res* 2004;55:927-34.
 36. Danielsen SA, Eide PW, Nesbakken A, et al. Portrait of the PI3K/AKT pathway in colorectal cancer. *Biochim Biophys Acta* 2015;1855:104-21.
 37. Fichera A, Little N, Jagadeeswaran S, et al. Epidermal growth factor receptor signaling is required for microadenoma formation in the mouse azoxymethane model of colonic carcinogenesis. *Cancer Res* 2007;67:827-35.
 38. 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 (Pt 1):213-25.

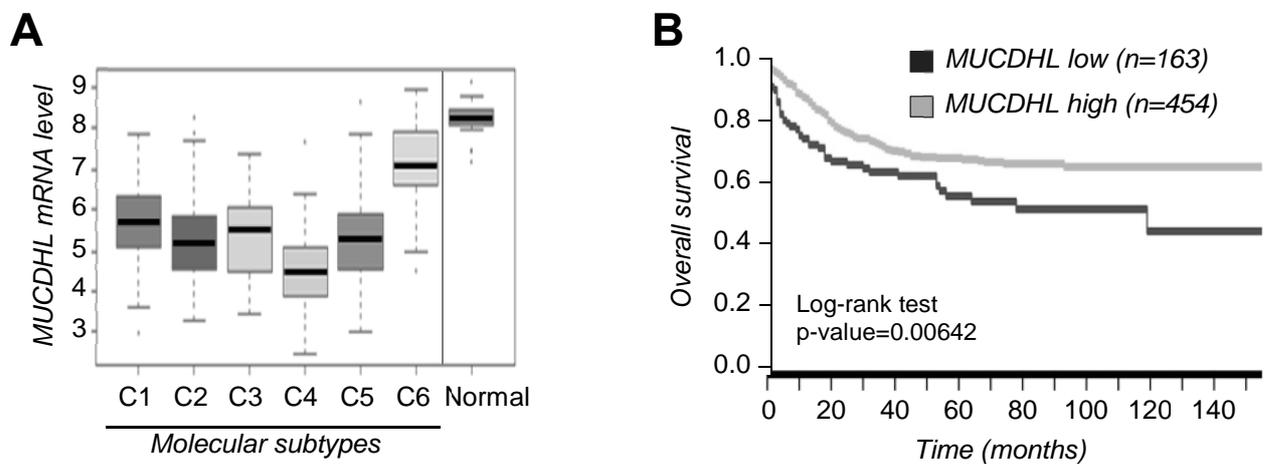


Figure 1. Reduced expression of *MUCDHL* in human colon tumors is an adverse event.

(A) Boxplot of the *MUCDHL* expression level in the normal or tumoral colon samples (N=443) grouped in the molecular subtypes established by Marisa et al {Marisa, 2013 #293}. Data are given \pm SD (B) Kaplan-Meier plot illustrating overall survival over time for colon cancer patients (N=557) according to *MUCDHL* expression (low versus high) within the tumor. A log-rank test was used to calculate P-value ($p=0.00642$).

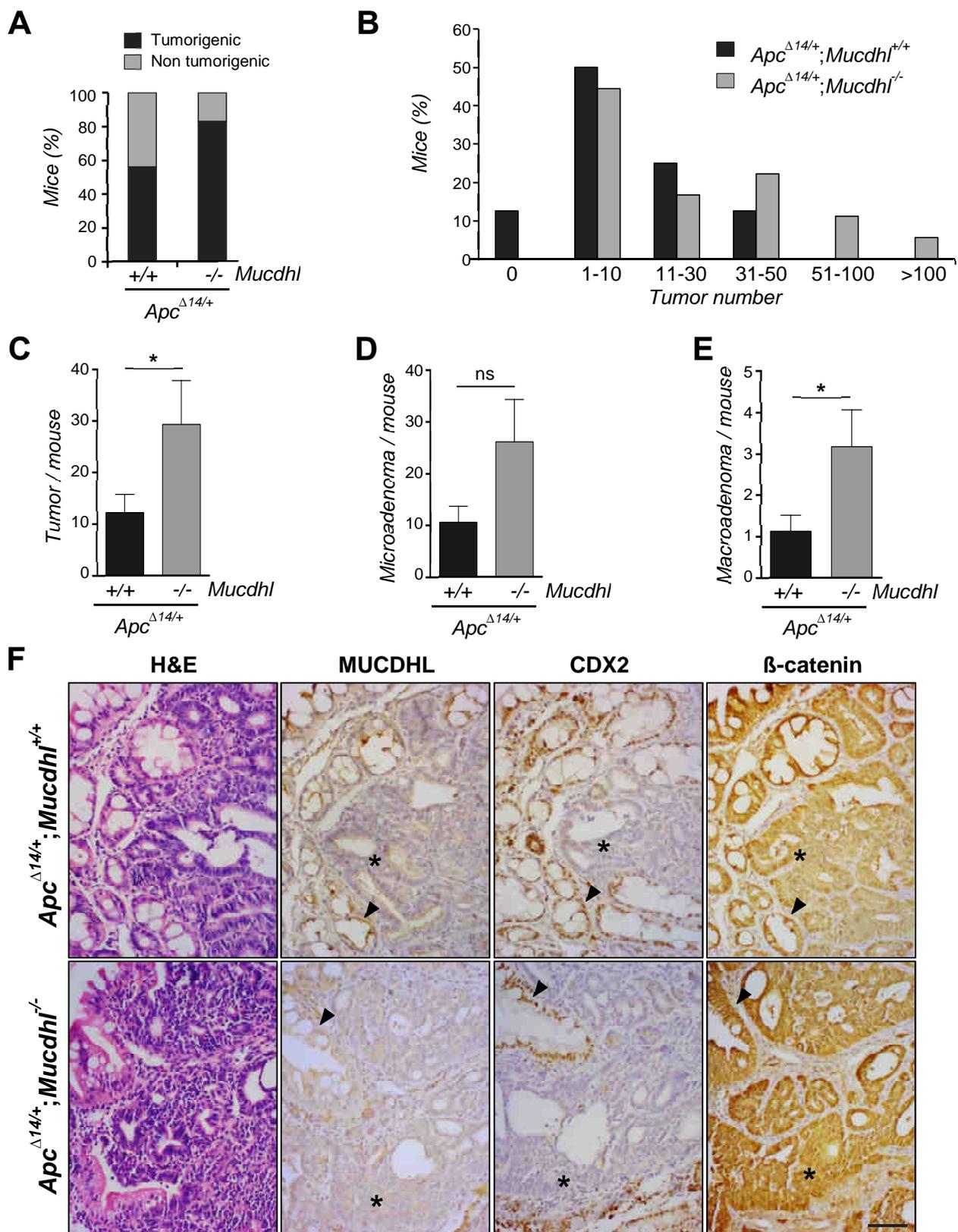


Figure 2. Loss of *Mucdhl* expression enhances intestinal tumorigenesis in mice.

$Apc^{\Delta14/+}; Mucdhl^{+/+}$ (n=16) and $Apc^{\Delta14/+}; Mucdhl^{-/-}$ (n=18) mice were regularly inspected for signs of neoplasia (rectal bleeding, anemia) and sacrificed at 6-8 months. (A) Tumorigenesis (black, % of total number of mice) was assessed by macroscopical examination of the whole intestinal tract (detection of at least one macroadenoma) and/or symptoms of the disease (rectal bleeding, anemia, splenomegaly). (B) Distributions are expressed as the percentage of mice (black bars: $Apc^{\Delta14/+}; Mucdhl^{+/+}$; grey bars: $Apc^{\Delta14/+}; Mucdhl^{-/-}$) having 0, 1-10, 11-30, 31-50, 51-100 or over 100 polyps in the intestinal tract. (C) Macroscopically-detectable tumors were counted to calculate average number / mouse (mean \pm SE; Student's t test; * $p < 0.05$). (D) Same as (C) for tumors of diameter smaller than 5 mm. (E) Same as (C) for tumors of diameter larger than 5 mm. (F) Paraffin-embedded sections of representative tumors were stained with H&E or immunolabeled with antibodies detecting MUCDHL, CDX2 or β -catenin. Stars indicate tumor areas with reduced expression of MUCDHL / CDX2 and nuclear localization of β -catenin, while arrowheads point to normal mucosa. Scale bar, 50 μ m.

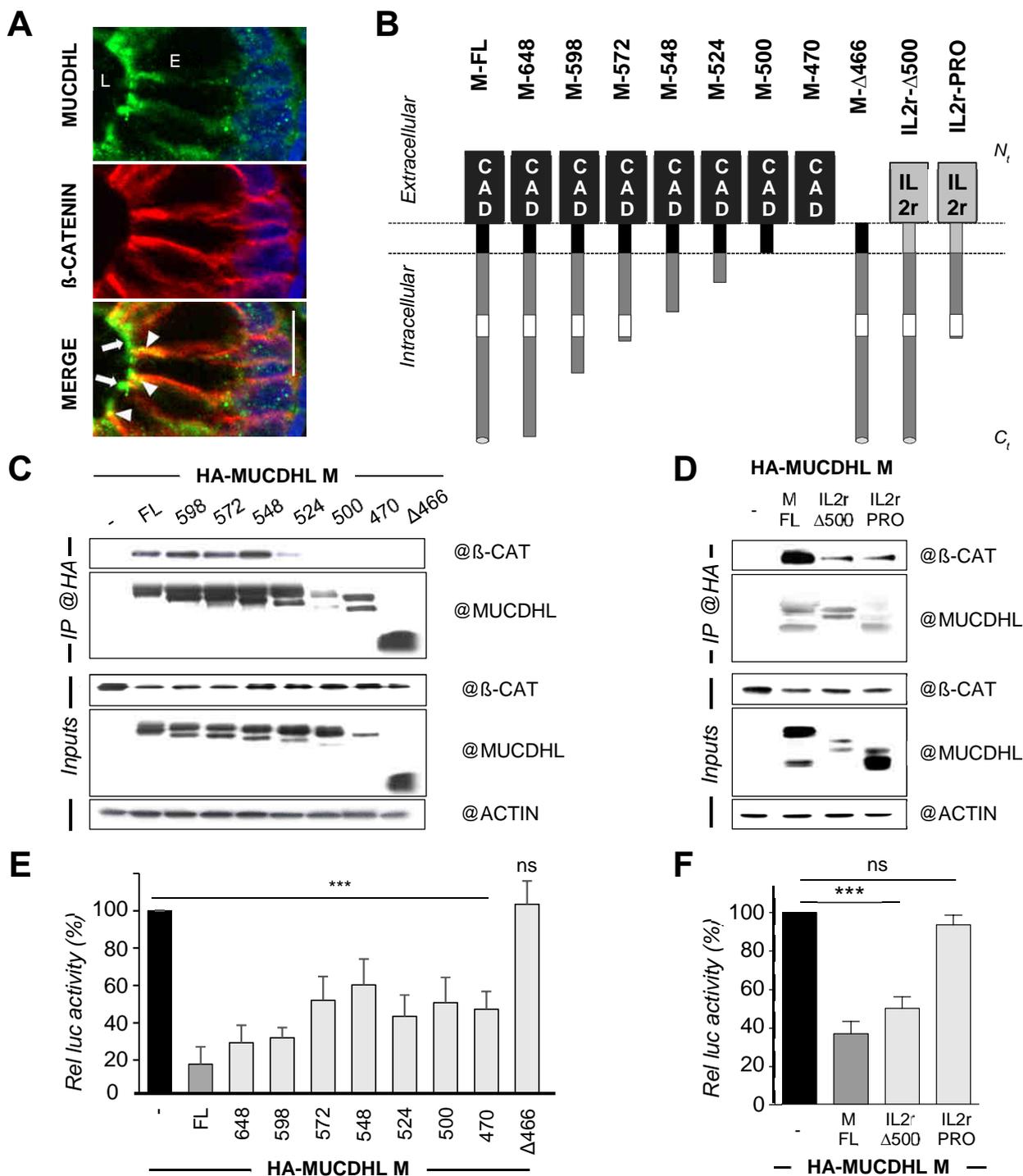


Figure 3. MUCDHL M antagonizes the transcriptional activity of β -catenin by multiple mechanisms.

(A) Immunofluorescence detection of nuclei (all pictures, blue signal), MUCDHL (top picture, green signal), β -catenin (middle picture, red signal) or both proteins (bottom picture, merged yellow signal) in human colon sections. Arrows: brush border localization of MUCDHL; arrowheads: co-localization of MUCDHL with β -catenin at the lateral side; L: lumen; E: enterocytes. Scale bar, 50 μ m. (B) Schematic representation of the different MUCDHL M proteins used in the study. Full-length MUCDHL M protein has 651 aa, a cadherin domain with 4 EC repeats at its N-terminal (Nt) extremity (CAD, not drawn to scale), a short transmembrane domain (24 aa, black) and a cytoplasmic region (151 aa) exhibiting four potential SH3 binding motifs (Prolin-rich, white rectangle) and a PDZ binding motif (grey circle) at its C-terminal (Ct) extremity. Names of the C-terminally truncated proteins refer to the location of the STOP codon (M-x) and those of the N-terminally truncated proteins to the number of aa deleted (M- Δ x). (C) and (D) HEK293 cells were transfected with Flag- β -catenin S33Y and the indicated HA-MUCDHL plasmid before protein extraction and immunoprecipitation (IP) with an anti-HA antibody. Proteins in bulk lysates (inputs, 1%) and immunoprecipitates were separated by SDS-PAGE and detected by Western blot using the indicated antibodies (@). (E) and (F) HEK293 cells were transfected with the indicated MUCDHL-expressing plasmid or the corresponding empty plasmid (-), β -catenin S33Y and TCF4-expressing plasmids, the TopFlash reporter plasmid and a promoter-less renilla reporter plasmid (internal control) before lysis and luminescence measurement. Relative promoter activity (\pm SD, normalized with renilla values) of the TopFlash reporter in the absence of MUCDHL M (-) was set at 100%. Data correspond to the mean of 3-4 independent experiments performed in triplicate (***) $p < 0.001$ and ns non-significant difference, using a one-way ANOVA followed by a Tuckey post-test).

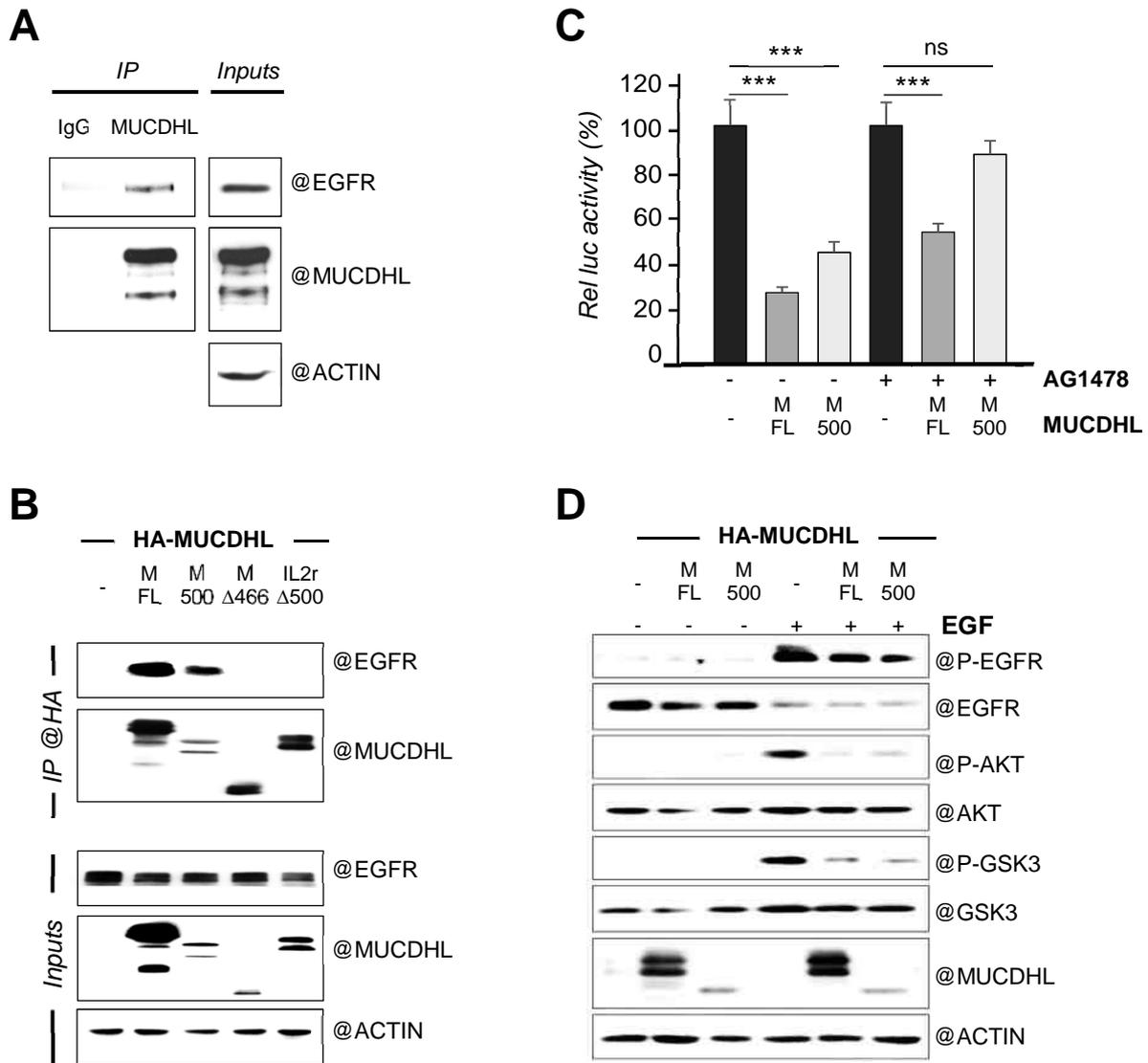


Figure 4. The extracellular region of MUCDHL M inhibits β -catenin by interfering with EGFR signaling.

(A) Colon carcinoma Caco2/TC7 cells were grown for 16 days to allow spontaneous differentiation [Chantret, 1994 #6] before lysis and immunoprecipitation with either a control (IgG) or a MUCDHL antibody. Proteins in bulk lysates (inputs, 1%) and immunoprecipitates were separated by SDS-PAGE and detected by Western blot using the indicated antibodies (@). (B) HEK293 cells were transfected with plasmids encoding EGFR-GFP and HA-tagged MUCDHL M, either the full-length protein (FL) or truncated versions (M-500: no cytoplasmic region; M- Δ 466: no extracellular region; IL2r- Δ 500: cytoplasmic region fused to IL2r), before protein extraction and immunoprecipitation (IP) with an anti-HA antibody. Input (1%) and immunoprecipitates were analyzed by immunoblotting with the indicated antibodies. (C) HEK293 cells were transfected with an empty plasmid (-) or a matching plasmid expressing HA-tagged MUCDHL M, either full-length (FL) or C-terminally-truncated (M-500: no cytoplasmic region), β -catenin S33Y and TCF4-expressing plasmids, the TopFlash reporter plasmid and a promoter-less renilla reporter plasmid (internal control). The next day cells were treated (+) or not (-) with AG1478 (20 μ M, 24h) before lysis and luminescence measurement. Relative promoter activities (\pm SD, normalized with renilla values) of the TopFlash reporter in the absence of MUCDHL M were set at 100%. Data correspond to the mean of 3 independent experiments performed in triplicates (***) $p < 0.001$, one-way ANOVA followed by a Tuckey post-test). (D) HEK293 cells were transfected with plasmids expressing HA-tagged MUCDHL M, either full-length (FL) or C-terminally-truncated (M-500: no cytoplasmic region), or the corresponding empty plasmid (-), serum-deprived the next day (overnight) and treated (+) or not (-) with EGF (30ng/ml for 4 min) before lysis. Western blot analyses were performed with antibodies recognizing only phosphorylated proteins (P: phospho) or all forms.

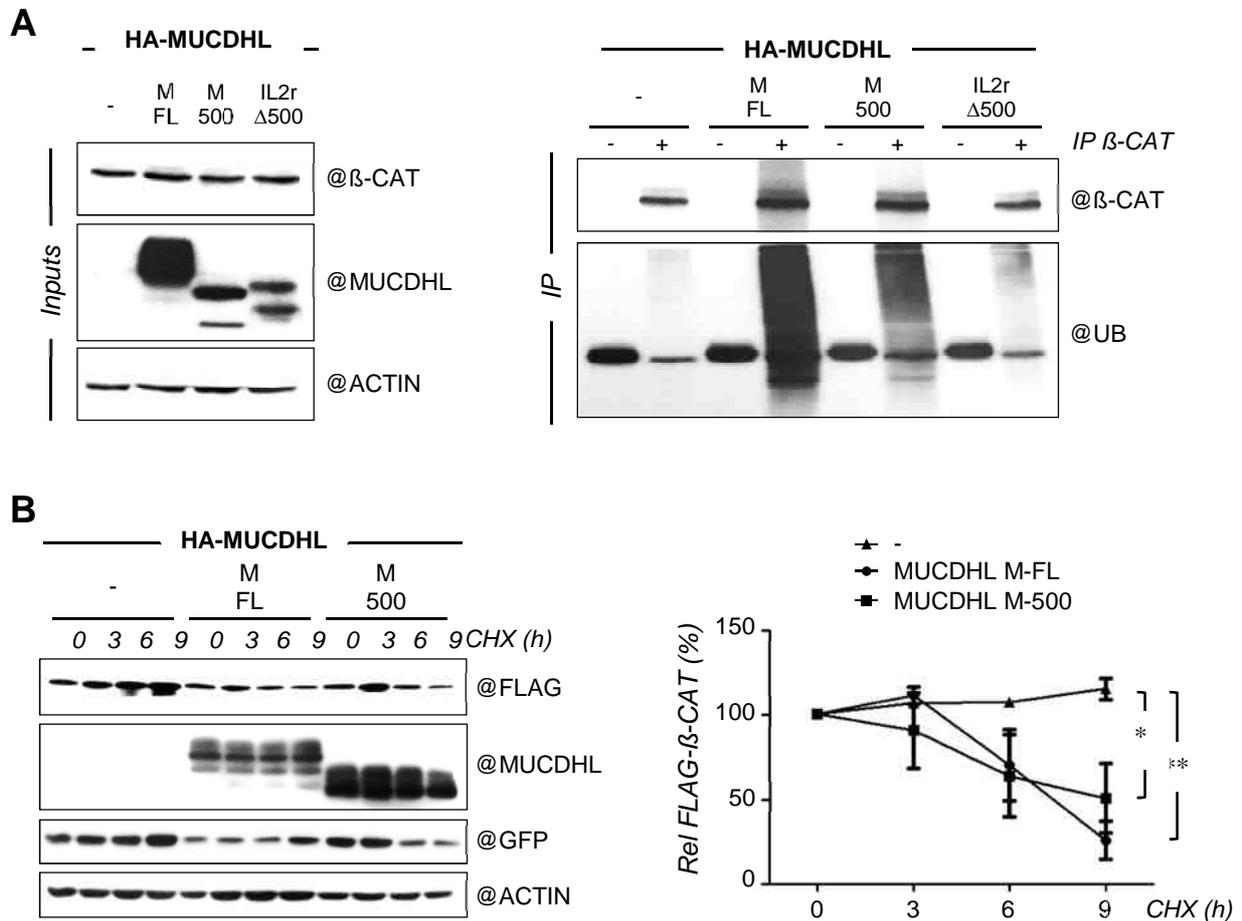


Figure 5. MUCDHL M can enhance the proteasome-mediated degradation of β -catenin.

(A) HEK293 cells were transfected with plasmids expressing or not (-) various forms of HA-tagged MUCDHL M (FL: full-length; M-500: no cytoplasmic region; IL2r- Δ 500: cytoplasmic region fused to IL2r) and treated with MG132 (10 μ M) overnight before protein extraction and immunoprecipitation (IP) with a β -catenin antibody (+) or control IgG (-). Proteins in bulk lysates (inputs, 1%) and immunoprecipitates were separated by SDS-PAGE and detected by Western blot using the indicated antibodies (@). The smear observed with the anti-ubiquitin antibody (UB) is typical of poly-ubiquitination. (B) HEK293 were first transfected as above plus a plasmid expressing FLAG- β -catenin, treated or not (0) with cycloheximide (CHX, 100 μ g/ml) for 3, 6 or 9 h before lysis and analysis of extracts by Western blot. A representative blot is displayed on the left and the quantification of 3 independent experiments is shown on the right. The relative amount of β -catenin (normalized with GFP and Actin signals) without cycloheximide was set at 100% for each condition (***) $p < 0.001$, one-way ANOVA test followed by a Tuckey post-test).

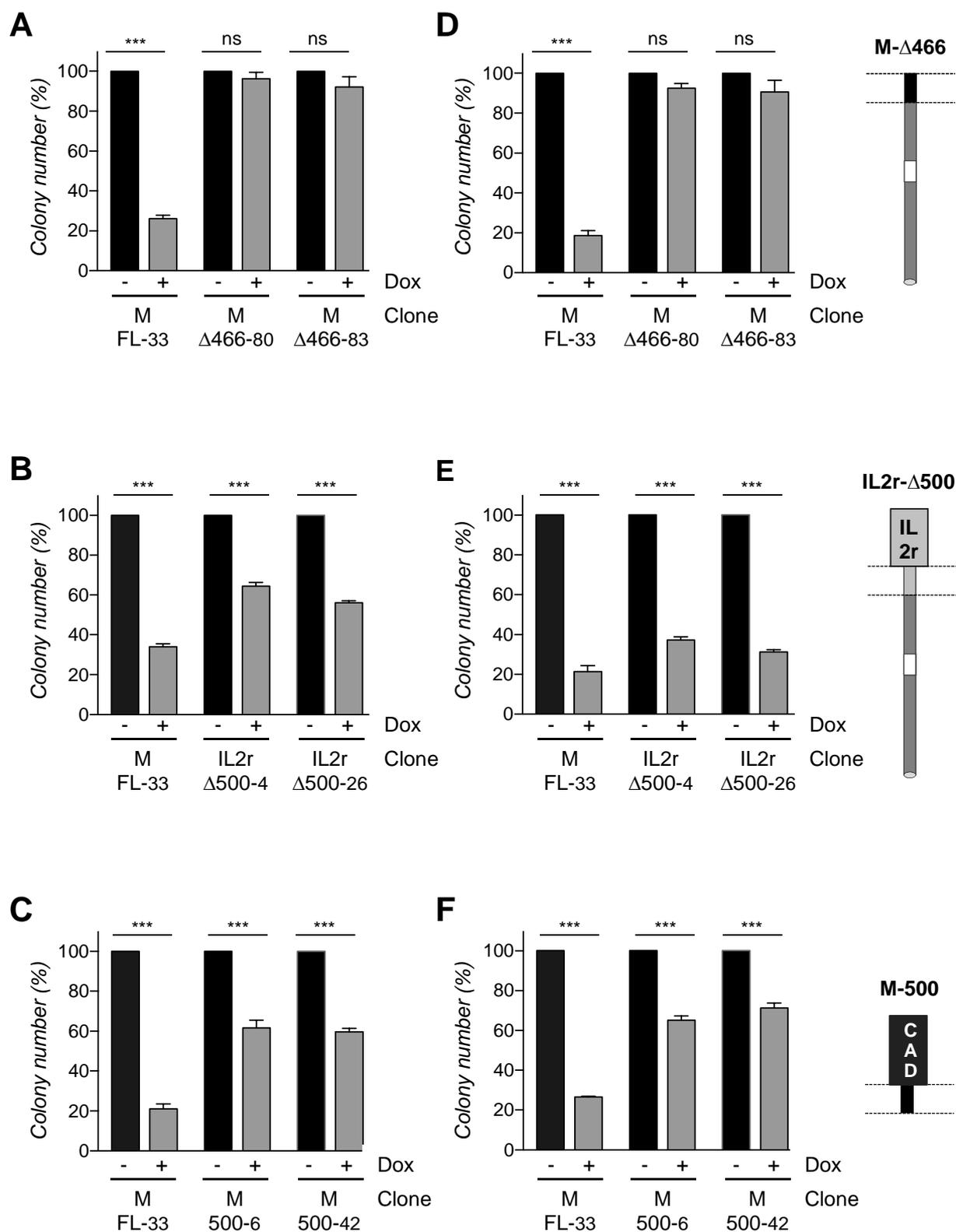
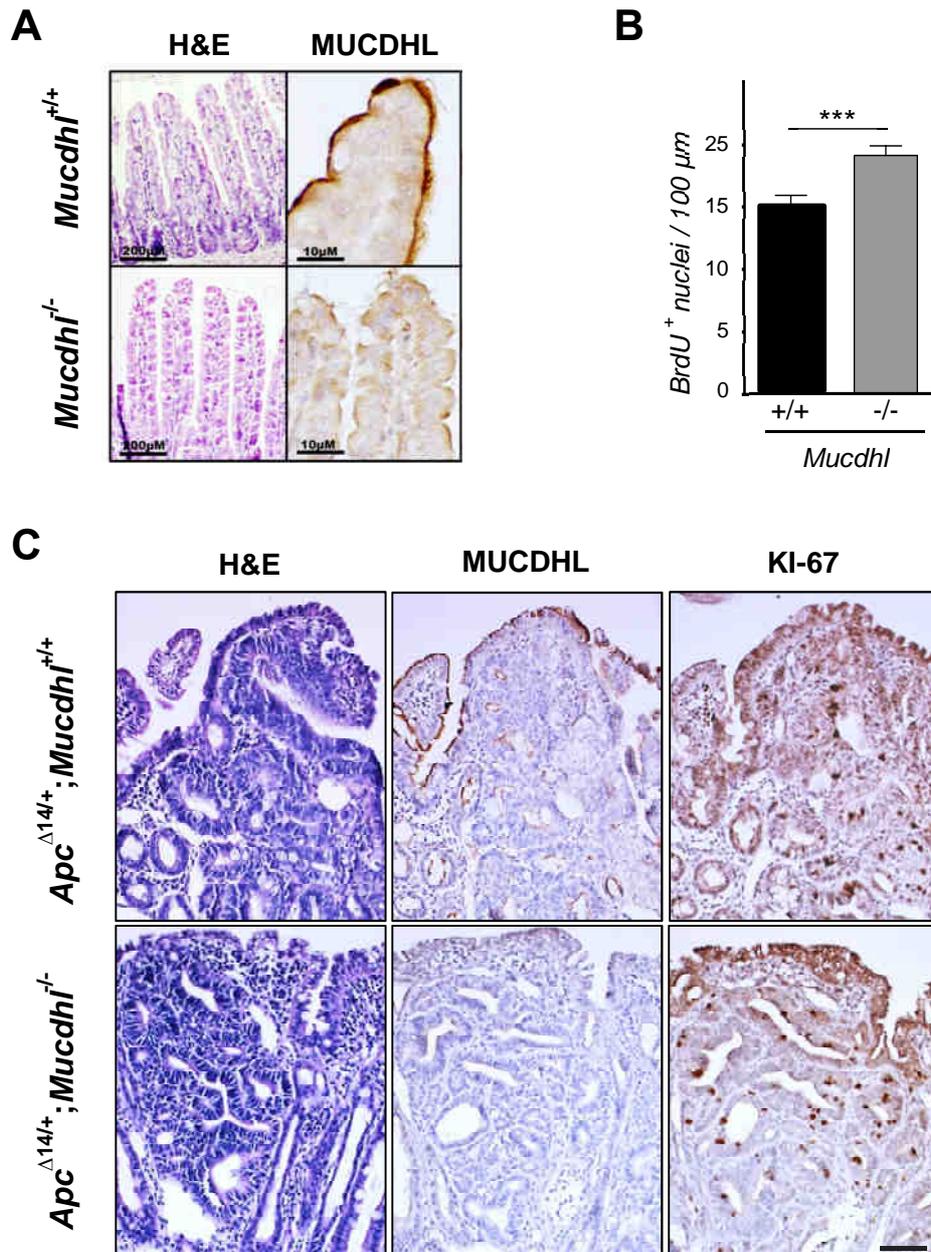
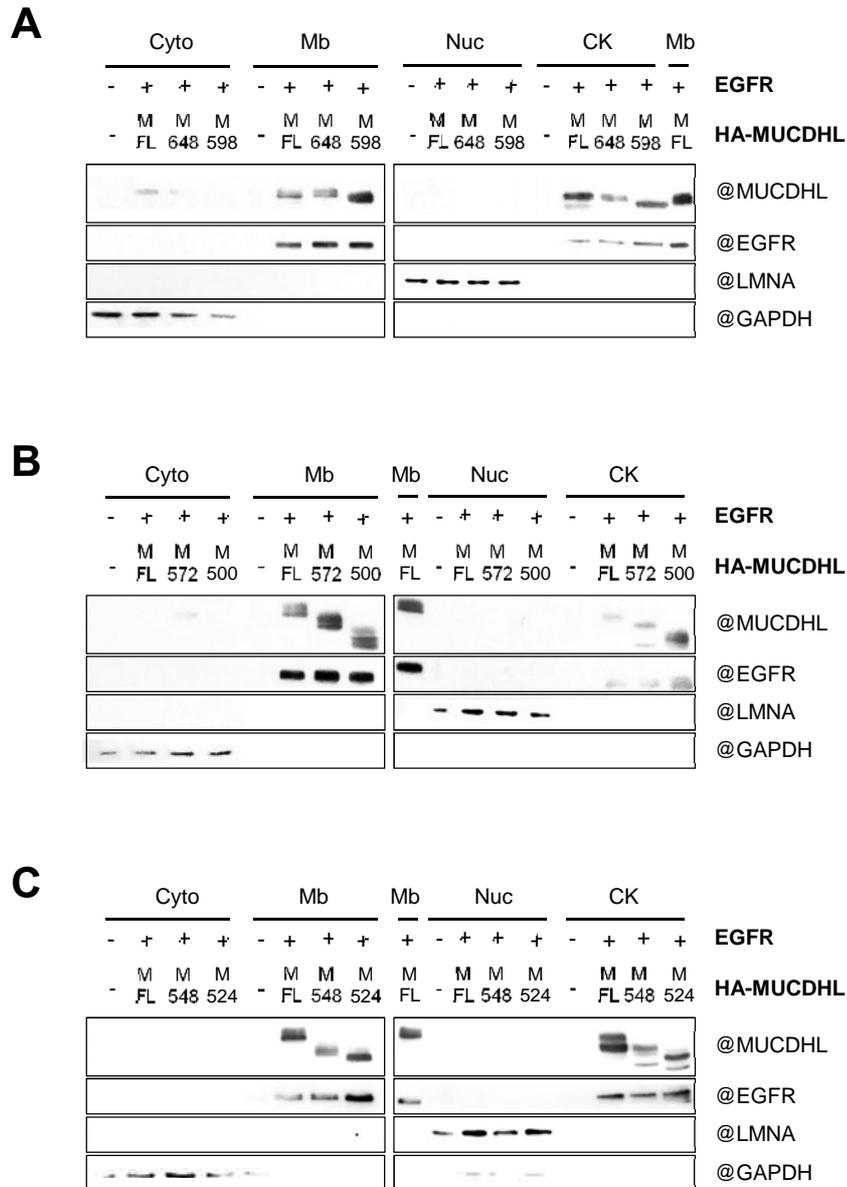


Figure 6. Both intracellular and extracellular domains of MUCDHL M have anti-tumor potential.

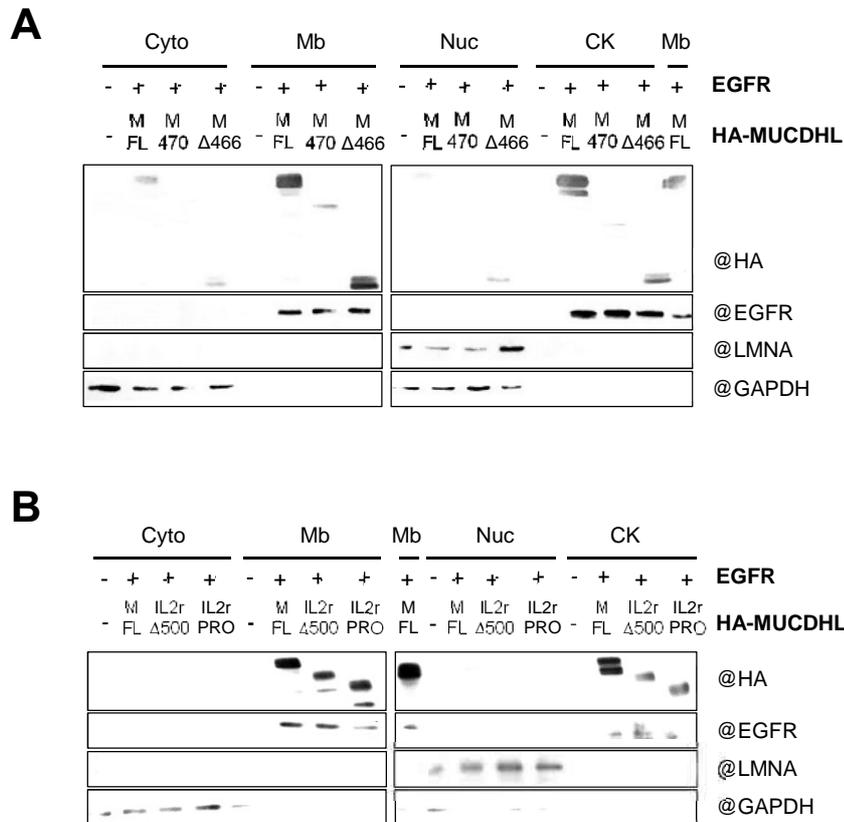
(A) (B) and (C) Clonogenic assays were performed with HCT116 clones expressing either full-length MUCDHL M (M-FL: clone 33), its cytoplasmic domain (M- Δ 466: clones 80 and 83), its cytoplasmic domain fused to IL2r (IL2r- Δ 500: clones 4 and 26) or its extracellular domain (M-500: clones 6 and 42) in the presence (+) of doxycycline in the culture medium. Colonies were fixed, stained with Crystal violet and counted. Number of colonies counted in the absence of doxycycline (-) for each clone was set at 100%. Data correspond to average numbers of colonies (% \pm SE) in 3 independent experiments performed in triplicates (***) $p < 0.001$, one-way ANOVA test followed by a Tuckey post-test). (D) (E) and (F) Same as above with clones seeded in soft agar to evaluate their anchorage-independent growth potential.



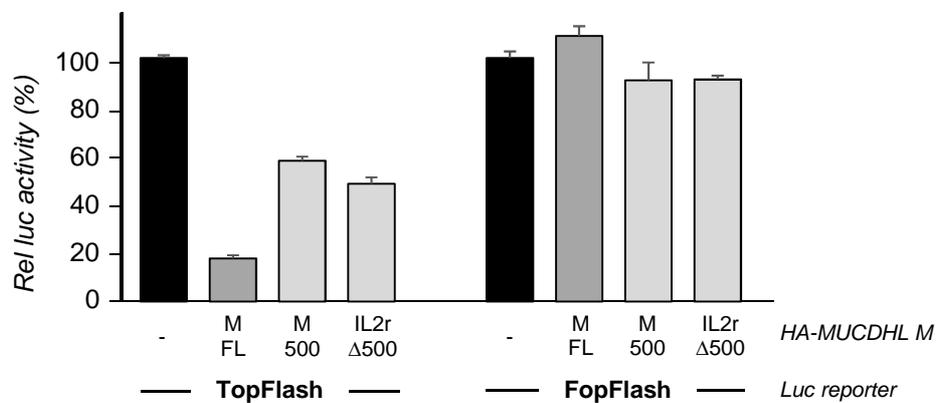
Supplementary Figure 1. Impact of *Mucdhl* deficiency on intestinal mucosa in mice (A) H&E staining and immunolabeling with a rabbit anti-MUCDHL antibody (H225, Santa Cruz Biotech) of paraffin-embedded sections of the ileum indicate that despite the absence of MUCDHL expression, the mucosa of *Mucdhl*^{-/-} mice has the same appearance with characteristic crypts and villi than that of *Mucdhl*^{+/+} mice. (B) Evaluation of BrdU labeling (sheep anti-BrdU biotinylated antibody, 1/2000, Abcam, Cambridge, UK) on paraffin-embedded ileal sections of *Mucdhl*^{+/+} or *Mucdhl*^{-/-} BrdU-injected mice (Sigma, 1 mg, ip injection for 3h) shows that proliferation is slightly increased in absence of MUCDHL expression (n=45 areas counted with 3 mice per genotype; mean ± SE; Student's t test; *** p < 0.001). (C) H&E staining and immunolabeling of a proliferation marker (KI67, clone SP6, 1/250; Thermo Fisher Scientific) show no obvious difference in grade, aggressiveness or proliferation between ileal tumors of *Apc*^{Δ14/+}; *Mucdhl*^{+/+} and *Apc*^{Δ14/+}; *Mucdhl*^{-/-} mice. Scale bar, 50 µm.



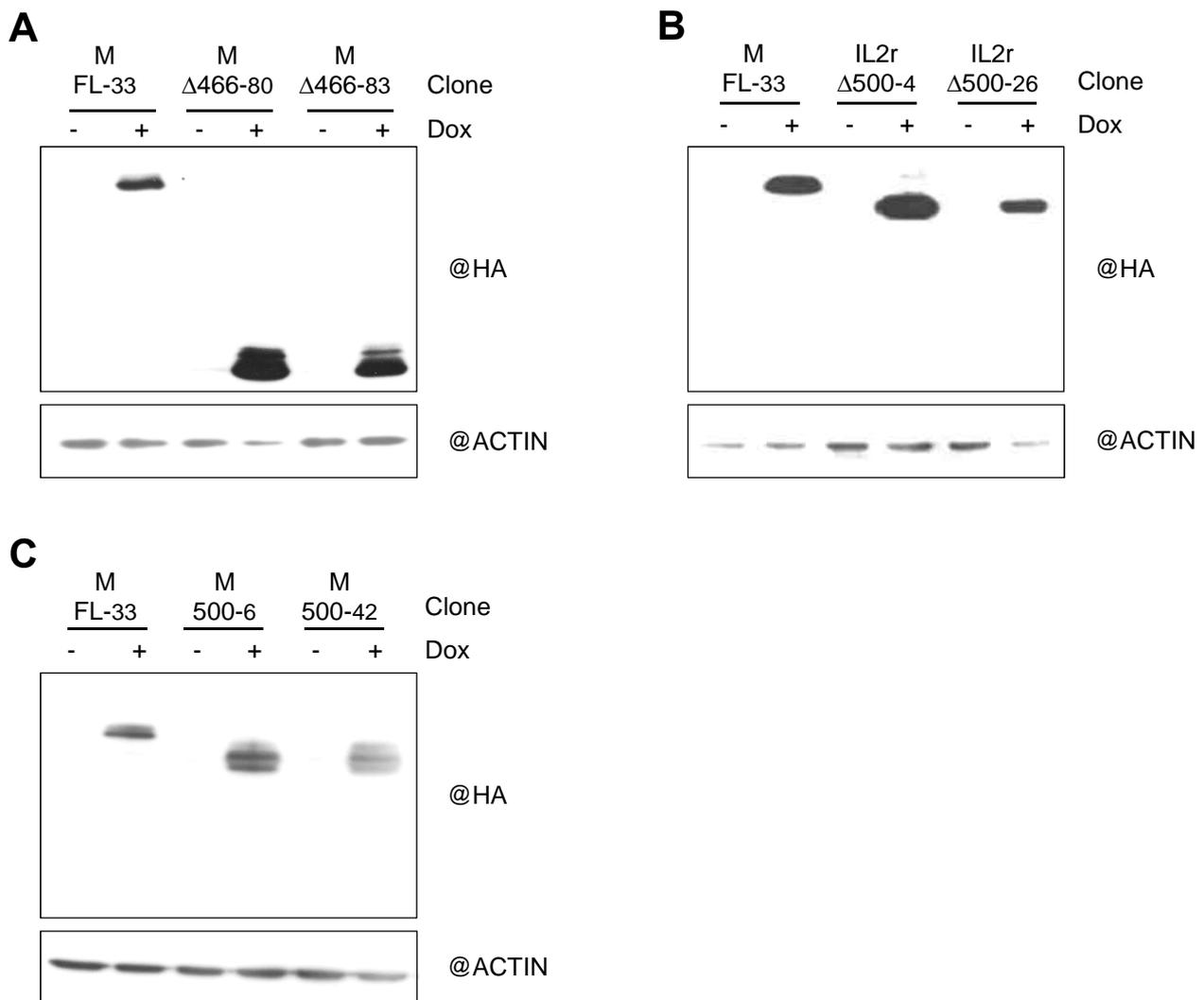
Supplementary Figure 2. Expression and sub-cellular localization of cytoplasmic tail-deleted MUCDHL proteins (A), (B) and (C) HCT116 cells were transfected for 48h as indicated with plasmids encoding EGFR and different forms of MUCDHL M (M-FL, 648, 598, 572, 548, 524, 500) before cell lysis, sub-cellular fractionation (Subcellular Protein Fractionation Kit for Cultured Cells, Thermo Fisher Scientific) and analysis by immunoblotting with the indicated antibodies. Quality of the fractionation procedure was checked with control antibodies (nucleus: R@ Lamin A H-102, Santa Cruz Biotech, 1/300; cytoplasm: G@GAPDH V-18, Santa Cruz Biotech, 1/10000; membrane and cytoskeleton-associated: R@EGFR #2430, Abcam, 1/3000). All the MUCDHL variants were detected at the expected size and in the same sub-cellular fraction as full-length MUCDHL (i.e. membrane and cytoskeleton-associated). Cyto (cytoplasmic fraction); Mb (membrane fraction); Nuc (soluble nuclear fraction); CK (cytoskeleton-associated fraction); LMNA: Lamin A.



Supplementary Figure 3. Expression and sub-cellular localization of truncated and fusion MUCDHL proteins. (A) and (B) HCT116 cells were transfected for 48h as indicated with plasmids encoding EGFR and different forms of MUCDHL M (M-FL, 470, Δ466, IL2r-Δ500, IL2r-PRO) before cell lysis, sub-cellular fractionation (Subcellular Protein Fractionation Kit for Cultured Cells, Thermo Scientific, Rockford, IL) and analysis by immunoblotting with the indicated antibodies. Quality of the fractionation procedure was checked with control antibodies (nucleus: R@ Lamin A H-102, Santa Cruz Biotech, 1/300; cytoplasm: G@GAPDH V-18, Santa Cruz Biotech, 1/10000; membrane and cytoskeleton-associated: R@EGFR #2430, Abcam, 1/3000). All the MUCDHL variants were detected at the expected size and in the same sub-cellular fraction as full-length MUCDHL (i.e. membrane and cytoskeleton-associated). Cyto (cytoplasmic fraction); Mb (membrane fraction); Nuc (soluble nuclear fraction); CK (cytoskeleton-associated fraction); LMNA: Lamin A.



Supplementary Figure 4. Full-length and truncated forms of MUCDHL M specifically antagonize the transcriptional activity of β -catenin. HEK293 cells were transfected with the indicated MUCDHL-expressing plasmid or the corresponding empty plasmid (-), β -catenin S33Y and TCF4-expressing plasmids, the promoter-less renilla reporter plasmid (internal control) and the TopFlash (3 wild-type copies of TCF binding site) or the FopFlash (3 mutated copies of TCF binding site) reporter plasmid before lysis and luminescence measurement. Relative promoter activity (\pm SD, normalized with renilla values) of the firefly luciferase reporter in the absence of MUCDHL M (-) was set at 100%. Data correspond to a representative experiment performed in triplicate.



Supplementary Figure 5. Expression of MUCDHL proteins in inducible HCT116 stable cell lines. (A) Western blot analysis with a rat anti-HA antibody (1/5000, 3F10, Roche) indicates that expression of HA-tagged MUCDHL M, either as full-length (clone 33) or truncated to its cytoplasmic domain (M- Δ 466: clones 80 and 83) is induced by doxycycline (1 μ g/ml, 48h). An actin antibody was used to control protein loading and transfer. (B) Same as in (A) for HCT116 expressing the full-length protein (clone 33) or a fusion form composed of its cytoplasmic domain and IL2r (IL2r- Δ 500: clones 4 and 26). (C) same as in (A) for HCT116 expressing the full-length protein (clone 33) or a truncated form without the cytoplasmic region (M-500: clones 6 and 42).

Projet II

Identifier de nouveaux relais moléculaires ou modulateurs de
l'activité anti-tumorale de MUCDHL

Résultats

I- Résumé des résultats obtenus

1. Identification d'un nouvel interactant de MUCDHL : ANK3

MUCDHL est une Cadhérine atypique impliquée dans l'homéostasie intestinale et qui agit comme un suppresseur de tumeur dans l'intestin (Beck *et al.*, en préparation). Néanmoins, le mode d'action moléculaire et cellulaire de MUCDHL reste encore peu connu à ce jour et pourrait différer des Cadhérines classiques car MUCDHL possède un certain nombre de particularités structurales. Comme les protéines qui interagissent avec MUCDHL sont susceptibles de relayer ou moduler son activité, nous avons effectué un crible de double hybride chez la levure avec la partie intracellulaire de MUCDHL et une banque d'ADNc de côlon humain. Parmi les protéines identifiées, celle qui a obtenu le score d'interaction probable le plus élevé est Ankyrine 3 (ANK3), une protéine impliquée dans la formation de complexes membranaires reliés au cytosquelette (Cunha *et al.*, 2009). Dans un premier temps, nous avons cherché à vérifier si ANK3 pouvait interagir avec MUCDHL en examinant son profil d'expression et sa localisation sub-cellulaire dans les cellules intestinales. Comme observé précédemment pour MUCDHL (Hinkel *et al.*, 2012), ANK3 est régulé positivement par la différenciation spontanée des cellules cancéreuses du côlon Caco-2/TC7. De plus, l'étude de coupes de côlon humain par immunofluorescence indique qu'ANK3 et MUCDHL présentent une co-localisation partielle dans des cellules différenciées de l'épithélium intestinal. Ces résultats, ainsi que la réalisation d'expériences de co-immunoprécipitation, nous ont permis de confirmer l'interaction entre ANK3 et MUCDHL.

2. ANK3 régule l'activité et la stabilité protéique de MUCDHL

Nous avons ensuite analysé l'impact fonctionnel d'ANK3 sur MUCDHL en utilisant une stratégie de perte de fonction d'ANK3, via l'utilisation de deux siRNA différents. Nous avons ainsi examiné si l'absence d'ANK3 modifie la capacité de MUCDHL M à inhiber l'activité transcriptionnelle de la β -caténine (Hinkel *et al.*, 2012). Effectivement, l'inhibition d'ANK3

Résultats

réduit la capacité de MUCDHL M à diminuer l'activité de la β -caténine, indiquant une contribution d'ANK3 à l'activité de MUCDHL. Nous avons également effectué des co-immunoprécipitations et constaté que la capacité de MUCDHL à interagir avec la β -caténine est réduite en absence d'ANK3, ce qui pourrait être à l'origine d'une inhibition moins efficace.

Afin de déterminer comment ANK3 favorise l'activité de MUCDHL, nous avons émis deux hypothèses différentes. La première hypothèse était qu'ANK3 interagisse à la fois avec MUCDHL et la β -caténine, et serve ainsi de lien protéique entre les deux protéines. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons cherché s'il existait une interaction entre la β -caténine et ANK3, ce qui ne semble pas être le cas, puisque nous n'avons pas été en mesure de détecter une co-immunoprécipitation d'ANK3 et de la β -caténine. La seconde hypothèse était qu'ANK3 joue un rôle sur la localisation sub-cellulaire de MUCDHL. Nous avons testé cette seconde hypothèse en étudiant par immunofluorescence la localisation sub-cellulaire de MUCDHL en absence ou en présence d'ANK3. De manière inattendue, l'inhibition d'ANK3 dans les cellules Caco-2/TC7 conduit à une diminution drastique de MUCDHL. De la même manière, l'inhibition d'ANK3 dans les cellules HEK293, entraîne une diminution de MUCDHL, à condition que seules des petites quantités de MUCDHL soient transfectées. Ce résultat suggère que la diminution d'activité de MUCDHL vis à vis de la β -caténine en absence d'ANK3 soit en partie due à la diminution de son expression.

Dans ce contexte, nous avons cherché à déterminer si ANK3 pouvait jouer un rôle sur la stabilité protéique de MUCDHL. Pour cela, nous avons d'abord montré que MUCDHL est poly-ubiquitinée et dégradée par le protéasome. Ensuite, nous avons montré que la poly-ubiquitination de MUCDHL est augmentée lorsque ANK3 est inhibée par siRNA. Enfin, en bloquant la synthèse protéique avec de la cycloheximide, nous avons constaté que le niveau des protéines MUCDHL décroît plus rapidement en absence qu'en présence d'ANK3, ce qui démontre le rôle d'ANK3 sur la stabilité protéique de MUCDHL.

Résultats

3. Identification d'une isoforme spécifique d'ANK3 dans les cellules épithéliales intestinales : ANK3_149

L'épissage alternatif permet de générer plusieurs isoformes d'ANK3 et cinq transcrits d'ANK3 différents (NM_001149.3, NM_001204403.1; NM_001204404.1, NM_001320874.1 et NM_020987.5) sont actuellement référencés dans Genebank. Nous avons donc cherché à identifier quelle isoforme interagit avec MUCDHL dans les cellules intestinales. Pour cela, nous avons étudié le profil d'expression des différents variants d'ANK3 le long du tractus digestif à l'aide d'échantillons humains. Ainsi, nos résultats indiquent que les isoformes *ANK3_987*; *ANK3_874*; *ANK3_404* et *ANK3_403* sont fortement exprimées au sein de l'œsophage et de l'estomac, mais très peu exprimées dans l'intestin, le côlon et le rectum. A l'inverse, l'isoforme *ANK3_149* n'est quasiment pas exprimée dans l'œsophage, est faiblement exprimée dans l'estomac, mais est fortement exprimée dans l'intestin, le côlon et le rectum. L'étude de l'expression de *MUCDHL* indique que *MUCDHL* présente un profil similaire à celui de l'isoforme *ANK3_149* avec une faible expression dans l'estomac et une forte expression dans l'intestin, le côlon et le rectum. Nous avons également examiné le profil d'expression des différents transcrits *ANK3* lors de la différenciation des cellules Caco-2/TC7. A nouveau, le transcrit *ANK3_149* est le seul dont l'expression est régulée positivement dans les cellules différenciées par rapport aux cellules non différenciées. L'ensemble de ces résultats confirme l'expression d'ANK3 dans l'épithélium intestinal humain (Peters *et al.*, 1995), mais démontre que l'isoforme majoritairement exprimée dans les cellules matures est *ANK3_149*.

Par conséquent, nous avons sous-cloné la séquence de ce transcrit dans un plasmide d'expression et avons découvert que la protéine produite à partir de ce transcrit dans les cellules transfectées avait le même poids moléculaire que la principale protéine ANK3 endogène dans les cellules Caco-2/TC7 ou les cellules HEK293. En outre, la surexpression de l'isoforme *ANK3_149* renforce la capacité de MUCDHL M à interagir avec la β -caténine et à inhiber son activité transcriptionnelle. Globalement, ces résultats indiquent que l'activité et la stabilité de MUCDHL sont régulées par une isoforme spécifique d'ANK3 exprimée dans des cellules intestinales matures.

Résultats

Enfin, l'expression de MUCDHL étant diminuée dans les pathologies intestinales humaines telles que les CCR et MICI (Losi *et al.*, 2010), nous avons étudié l'expression d'ANK3 dans ces pathologies. L'analyse de biopsies coliques humaines nous a permis de mettre en évidence que comme pour *MUCDHL*, l'expression de l'isoforme *ANK3_149* est significativement diminuée en contexte tumoral et inflammatoire dans l'épithélium intestinal humain.

II- Publication

A specific isoform of the adapter protein ANK3 regulates the activity and stability of the atypical Cadherin MUCDHL in the intestine

Short Title: ANK3 regulates the stability of MUCDHL

MARINE BECK¹, ELISABETH MARTIN¹, JEAN-BAPTISTE DELHORME^{1,2}, EMILIE BERSUDER¹, LAURA LE COM^{1,3}, JEAN-MARIE REIMUND^{1,3}, JEAN-NOEL FREUND¹ AND ISABELLE GROSS^{1*}

¹Université de Strasbourg, INSERM, IRFAC UMR-S 1113, F-67000 Strasbourg, France

²Service de Chirurgie Générale et Digestive, Hôpitaux Universitaire de Strasbourg, Hôpital de Hautepierre, F-67000 Strasbourg, France

³Service d'Hépatogastroentérologie et d'Assistance Nutritive, Hôpitaux Universitaire de Strasbourg, Hôpital de Hautepierre, F-67000 Strasbourg, France

Grant Support: supported by INSERM (2013-2017 to JNF), by ARC (AO 2010 to IG) and by La Ligue Contre Le Cancer (AO 2012 & 2015 to IG); MB was fellows of the French government (Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche) and ARC.

Abbreviations: CDHR (cadherin-related); aa (amino acid); IP (immunoprecipitation); RT (reverse transcription); qPCR (quantitative polymerase chain reaction)

*** Correspondence:**

Isabelle Gross, INSERM UMR_S1113, 3 avenue Molière, 67200 Strasbourg, France

Tel: 33 388 27 53 66 Fax: 33 388 26 35 38 Email: Isabelle.Gross@inserm.fr

Disclosures: The authors have no conflicts of interest to disclose.

Author Contributions: MB, IG and JNF designed the experiments; MB and EM performed the experiments; JMR provided human biopsies and JBD, EB, LLC provided human intestinal RNA; MB, IG and JNF analyzed the data; IG and JNF provided funding; MB and IG wrote the paper.

Abstract

Background & Aims: The atypical Cadherin MUCDHL plays an unconventional role in the intestinal epithelium and its expression is frequently reduced in pathological settings. There is little information concerning the molecular relays of MUCDHL activity, besides its interaction and inhibition of β -catenin. The goal of this study was to identify new interactants of MUCDHL and understand the functional consequences of their interaction with MUCDHL. **Methods:** MUCDHL interactants were identified by a yeast two hybrid screen and confirmed by co-immunoprecipitation in cell lines. Expression profiles were analyzed by RT-qPCR, western blot and immunofluorescence on human biopsies or cell lines. The functional impact was studied by loss (siRNA) and gain (plasmid) of function experiments.

Results: The adapter protein ANK3 identified via the two hybrid screen is able to form a complex with MUCDHL. MUCDHL and a specific variant of ANK3 (ANK3_149) are co-expressed and partially co-localize in differentiated cells of the intestinal epithelium. ANK3 enhances the inhibitory impact of MUCDHL M on β -catenin transcriptional activity by preventing its ubiquitination and proteasome-mediated degradation. In addition, like MUCDHL, ANK3 expression is diminished in cancerous and inflammatory colon mucosa.

Conclusion: This study shows that MUCDHL protein levels are regulated by an ubiquitin-mediated mechanism of degradation, which can be prevented in mature intestinal cells by its interaction with a specific ANK3 isoform. Importantly, the expression of this ANK3_149 isoform is decreased in pathological settings and thus may contribute to the loss of MUCDHL expression in colon cancer and IBD.

Keywords: intestine; CDHR5; cadherin-related gene; ANK3; stability

Introduction

Cadherins are cell surface glycoproteins that share a Ca^{2+} -dependent adhesive extracellular domain composed of at least two conserved cadherin repeats. With more than a hundred cadherins identified in humans, members of this large superfamily of proteins have been further classified into different families according to evolutionary, functional and structural criteria {Hulpiau, 2009 #451}. While classical cadherins such as E-cadherin have been extensively studied for their adhesive functions, there is much less information about members of other families. Yet, these cadherins exhibit distinct patterns of expression and may also play important roles in tissue morphogenesis and homeostasis by their involvement in processes such as cell-cell adhesion, cell recognition and signaling.

CDHR5 (also and hereafter called *MUCDHL*) belongs to the family of cadherin-related genes that encode the more divergent and peculiar cadherins (ex. FAT with 34 cadherin repeats). Identified nearly twenty years ago {Goldberg, 2002 #383;Moulton, 2004 #35}, *MUCDHL* has recently been given renewed attention for its singular role in the gut and dysregulation in intestinal diseases. Indeed, MUCDHL is prominently expressed in the intestinal epithelium where it shows a dual localization. As expected for a cadherin, MUCDHL is detected at the lateral borders of cells where it probably contributes through intercellular adhesion to the barrier function of the intestinal epithelium {Hinkel, 2012 #209;Moulton, 2004 #35;Goldberg, 2000 #384}. However, as differentiation proceeds and cells get polarized, MUCDHL becomes mostly localized at their apical side facing the intestinal lumen {Crawley, 2014 #270;Knowles, 2015 #296;Moulton, 2004 #35}. This unusual localization for a cadherin correlates with the ability of MUCDHL to link together the tips of apical microvilli (i.e. actin-based membrane protrusions) and contribute to a well-organized brush border

that allows efficient nutrient absorption and host defense against the luminal microbiota {Crawley, 2014 #270}. Recent reports also hinted at a potential implication of MUCDHL in gut pathologies as its expression is reduced in the context of IBD (Inflammatory Bowel Diseases) and colon cancer {Bujko, 2015 #385;Hinkel, 2012 #209;VanDussen, 2018 #458;Losi, 2011 #264}. Actually, we showed that the loss of MUCDHL in colon cancer cells is an adverse event in mice and patients (Beck et al., in preparation) and that restoring MUCDHL expression in colon cancer cells reduced tumor growth in nude mice {Hinkel, 2012 #209}.

While the role of MUCDHL in the homeostasis of the gut has been highlighted, there is still little information available about its molecular mode of action. The *MUCDHL* gene generates two splice variants (L and M) that are mostly identical with the exception of juxtamembrane mucin-like repeats that are only present in the extracellular domain of MUCDHL L. Both MUCDHL isoforms display in their extracellular domain only four consecutive cadherin repeats instead of the five found in classical cadherins and an intracellular domain with no sequence homology with other cadherins but many potential protein-binding motifs {Goldberg, 2002 #383}. So far, only a limited number of proteins interacting with MUCDHL have been identified. These principally include another atypical cadherin called CDHR2 (also known as PCDH24 or LCK), which allows heterophilic adhesion of adjacent microvilli {Crawley, 2014 #270}, and β -catenin but only for the M isoform {Hinkel, 2012 #209;Parenti, 2010 #45} below the brush border (Beck et al., in preparation). β -catenin is a typical partner of cadherins, namely for E-cadherin that it connects to the actin cytoskeleton in adherens junctions {Mege, 2017 #386}. Besides its role in intercellular adhesion, β -catenin acts in the nucleus as a transcriptional co-activator for members of the TCF/LEF (T cell factor/lymphoid enhancer factor) family of proteins resulting in the up-regulation of a large set of downstream genes that promote stemness and proliferation in

intestinal cells {Novellademunt, 2015 #388}. Thus, MUCDHL might act as tumor suppressor in the colon by sequestering β -catenin at the plasma membrane. However, the antitumor activity of MUCDHL is probably relying on additional mechanisms as the L isoform was shown to reduce tumor growth without being able to bind to β -catenin {Hinkel, 2012 #209}.

In this study, we aimed to better understand how MUCDHL is functioning at the molecular level. We performed an unbiased screen to identify other proteins interacting with MUCDHL in intestinal cells and uncovered a post-translational mechanism of regulation that contributes to the activity of this atypical cadherin.

Materials and Methods

Cell Lines

Caco-2/TC7 cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle medium (Invitrogen, Carlsbad, CA) supplemented with 20% heat-inactivated fetal bovine serum (Invitrogen), 1% essential amino acids, and antibiotics. Human embryonic kidney HEK293 (American Type Culture Collection) were grown in Dulbecco's modified Eagle medium supplemented with 10% fetal bovine serum and antibiotics.

Human samples

Human samples, mostly originating from the General & Digestive Surgery Department and Hepato-Gastroenterology & Nutritional Assistance Department (Hautepierre Hospital, Strasbourg, France), were obtained through the Biological Resources Center (Strasbourg University Hospital, France). All patient gave their written informed consent for the analyses of their clinical and biological data. The database complies with

applicable local regulations and ethical principles (Declaration of Helsinki, Fortaleza 2013) related to data processing, files and personal freedom and privacy.

Plasmids

pRL-null was from Promega (Madison, WI) and pcDNA4/TO was from Invitrogen. pTopFlash, and pcDNA1 expressing Myc-tagged TCF4 were from H. Clevers (Utrecht University Medical Center, Utrecht, The Netherlands). pcDNA3 expressing Flag-tagged human- β -catenin WT or S33Y were from Addgene (Cambridge, MA; #16828, and #19286, {Kolligs, 1999 #47}). pcDNA4/TO-DHLM/HA that allows inducible expression of C-terminally HA-tagged full-length human MUCDHL M (NP_112554.2) was described {Hinkel, 2012 #209}. cDNAs containing the coding sequence of the transcript ANK3 (NM_001149.3) were obtained by reverse transcription (SuperScript III Reverse Transcriptase, Invitrogen) using RNA from differentiated Caco-2/TC7 cells and a specific primer (CTTATGATCCTTGACTGACCGTTCGC), then amplified by PCR with two other specific reverse and forward primers (CGATGACGACAAGCTTCTGGCTTTACCGCAGAGTGA, CCCGGGATCCTCTAGACTGTTACGAGTGGCTCTTC): the resulting PCR fragment was sub-cloned into *HindIII-XbaI*-linearized pFLAG-CMV2 (Sigma, Saint Louis, MO) using the In-Fusion® HD Cloning kit (Clontech Laboratories, Inc, Mountain View, CA) to generate pFLAG-ANK_149, whose coding sequence was verified by sequencing (GATC Biotech, Konstanz, Germany).

siRNA

Silencer Select siRNA control (Negative control#2) or directed against ANK3 (s1368, s1370) were purchased from Ambion (Thermofisher Scientific, Waltham, MA).

Yeast-two-hybrid screen

The yeast-two-hybrid screen (ULTimate Y2HTM) was performed by HYBRIGENICS (Paris). The intracellular region of human MUCDHL (aa 498-651 for M isoform) was fused to the DNA binding domain of the LexA protein (N-LexA-MUCDHL-C) and used to screen a human colon cDNA library (Human Colon_RP1).

Transfections

Plasmid transfections were performed as recommended with Jetprime (Polyplus Transfection, Illkirch, France) for protein assays and with JetPEI (Polyplus Transfection) for Luciferase assays. Co-transfection of plasmids and siRNA were made as advised with Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Cells were transfected by siRNA alone using Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) as instructed (HEK293 cells) or as a high-density suspension (Caco-2/TC7 cells, {Platet, 2017 #449}) to increase efficiency.

Luciferase Assays

Luciferase assays were performed with the Dual-Luciferase Reporter Assay (Promega) as described {Hinkel, 2012 #209}.

Immunoprecipitation, ubiquitination and stability assays

Cells were treated overnight with MG132 (10 μ M, Sigma) for all experiments including β -catenin. Lysis was performed with cold lysis buffer (2% NP40 - 150 mM NaCl - 50 mM Tris pH 7.5) containing protease inhibitors (Complete; Roche Applied Science, Germany).

For immunoprecipitation of exogenous proteins, 1 mg of cellular extract was incubated for 2 h at 4°C with 30 µL of anti-HA affinity matrix (Roche Applied Science, Germany). For immunoprecipitation of endogenous proteins, 3 mg of cellular extract were incubated overnight at 4°C with 1 µg of a goat anti-MUCDHL antibody (R&D Systems, Minneapolis, MN) or a mouse anti-β-catenin (clone 14, 1/5000; BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) and goat Ig or mouse Ig (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) were used as controls; 30 µL of protein G-Agarose beads (Roche) were added the last 45 min. In all cases, beads were next washed twice for 10 minutes with lysis buffer adjusted to 250 mM NaCl and twice for 10 minutes with lysis buffer adjusted to 500 mM NaCl, resuspended in 20 µL of Laemmli loading buffer (Bio-Rad, Hercules, CA), and boiled for 5 minutes before SDS-PAGE.

For ubiquitination assays, immunoprecipitation was performed as detailed above on 1 mg of MG132-treated cells, either with 1 µg of a goat anti-MUCDHL antibody or goat Ig, with beads being washed 2 times in lysis buffer and 3 times in stringent RIPA lysis buffer (1% NP40 - 0.5% Deoxycholate - 0.1% SDS - 500 mM NaCl - 50 mM Tris pH 7.5).

For stability assays, cells were not treated with MG132 but with cycloheximide (100 µg/mL, Calbiochem, Darmstadt, Germany) for different times before lysis in NP-40 buffer.

Western Blot

Western blot analyses were performed as described {Gross, 2008 #79} with one of the following primary antibodies: β-catenin (clone 14, 1/5000; BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ), MUCDHL (H-225, 1/5000; Santa Cruz Biotechnology), ANK3 (H-4, 1/1000; Santa Cruz Biotechnology), Ub (P4D1, 1/1000; Santa Cruz Biotechnology), and Actin (1/15000; EMD Millipore, Billerica, MA). Secondary antibodies (Mouse or Rabbit IgG HRP-linked whole Ab,

Amersham) were diluted at 1/10000 (ECL, Amersham) or 1/50000 (ECL Prime, Amersham). Signals were quantified either with Image J or with a PXI imaging system (Syngene, Bangalore, India).

Immunofluorescence (IF)

IF were performed on paraformaldehyde-fixed samples (cells or paraffin sections of human biopsies) using MUCDHL (H-225, 1/500; Santa Cruz Biotechnology), and ANK3 (H-4, 1/100; Santa Cruz Biotechnology) primary antibodies. Secondary antibodies were Rabbit IgG coupled with Alexa 488 or Mouse IgG coupled with Alexa 568 (1/500; Molecular Probes, Eugene, OR). Nuclei were marked with DAPI.

RT-qPCR

Total RNA was isolated using TRI Reagent (MRC, Cincinnati, OH). Reverse transcription (RT) was done with 2 µg of RNA using generally the High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, CA, USA) or Cloned AMV reverse transcriptase kit (Invitrogen) for tumoral samples. Quantitative polymerase chain reactions (qPCR) were performed in duplicate with 1/25th of the RT reaction as template, a TaqMan Gene Expression Assay (Applied Biosystems) and the FastStart Universal Probe Master buffer (Roche Applied Science, Germany). All 5 variants of ANK3 referenced in Genbank were detected with the probe *Hs00241738_m1*; the ANK3 *NM_001149.3* transcript was detected with the probe *Hs01097247_m1*; ANK3 *NM_001204403.1*, *NM_001204404.1*, *NM_001320874.1* and *NM_020987.5* transcripts were detected with the probe *Hs01088343_m1*. Analyses of RT-qPCR results were realized with the 7500 v2.0.1 software

(Applied Biosystems) using the $\Delta\Delta\text{Ct}$ method and the *TBP* (*TATA-binding protein*; *Hs00427620_m1*) or the β -2-M (β -2-MICROGLOBULIN; *Hs00187842_m1*) genes to normalize expression levels.

Statistical Analyses

A 1-way analysis of variance (ANOVA) test followed by a Tuckey post-test was used to analyze *in vitro* data and a Mann Whitney test was used to compare *in vivo* data.

Results

The adapter protein ANK3 is interacting with MUCDHL

In order to get more insight into the molecular mode of action and / or regulation of MUCDHL, we set to identify new interacting proteins. We performed a yeast two-hybrid screen using the intracellular domain of MUCDHL as bait and clones of a human colon library as preys. Only a few of the clones identified had a “very high” to “good” probability of interacting with MUCDHL according to the Predicted Biological Score algorithms and most of them relate directly or indirectly to the actin cytoskeleton (ex. TTN, ANK3, ACTG2). For instance, the scaffold protein Ankyrin 3 (ANK3) connects integral membrane proteins to the underlying cytoskeleton. Given that proteins of the Ankyrin family are involved in the formation and maintenance of specialized membrane sub-domains by assembling protein complexes, we decided to focus our study on ANK3 {Cunha, 2009 #454}.

We first checked whether ANK3 may interact with MUCDHL by verifying its expression pattern and sub-cellular localization in intestinal cells. As previously observed for

MUCDHL {Hinkel, 2012 #209}, ANK3 mRNA levels are up-regulated upon spontaneous differentiation of Caco-2/TC7 colon cancer cells {Chantret, 1994 #6} (Figure 1A). Accordingly, ANK3 protein expression is not detected by Western blot in undifferentiated Caco-2/TC7 cells but increases as differentiation proceeds (major band ~ 130 kDa, Figure 1B). Furthermore, ANK3 protein can be observed on human colon sections using immunofluorescence: ANK3 exhibits a dual localization, being present both at the lateral and apical side of absorptive cells (Figure 1C). As reported by others {Crawley, 2014 #270;Huels, 2015 #381}, MUCDHL is mostly localized at the brush border but also at the lateral membrane below the brush border. Double immunofluorescence confirmed that there is some overlap in the staining patterns of both proteins. Thus, ANK3 and MUCDHL are co-expressed and display partial co-localization in differentiated cells of the intestinal epithelium.

We next investigated more directly the potential ANK3/MUCDHL interaction by performing co-immunoprecipitation assays. We found that ANK3 is specifically co-immunoprecipitated with MUCDHL but only in differentiated Caco-2/TC7 cells that do express both proteins endogenously (Figure 2A). ANK3 was also pulled-down by the two isoforms of MUCDHL (M and L) upon overexpression in HEK293 cells (Figure 2B). Taken together these results confirm that MUCDHL and ANK3 interact together.

ANK3 contributes to MUCDHL activity

To determine the impact of ANK3 on MUCDHL activity, we used a loss of function strategy based on siRNA. RT-qPCR and Western blot analyses showed that two different siRNA efficiently silenced endogenous ANK3 expression in HEK293 cells (Figure 3A,

Supplementary Figure 1A). Previous studies had shown that MUCDHL M inhibits the transcriptional activity of β -catenin {Hinkel, 2012 #209}. This inhibitory effect can be assayed in HEK293 cells using the TOPFLASH luciferase reporter that reflects nuclear activity of β -catenin {Korinek, 1997 #5}. As expected, when ANK3 is expressed (siRNA Ct), overexpression of MUCDHL M leads to a strong decrease of the TOPFLASH luciferase activity (Figure 3B). However, when ANK3 is silenced by siRNA (siRNA ANK3#1 and ANK3#2), this inhibitory effect of MUCDHL M is two-times lower: indeed, while MUCDHL M inhibits 85% of the TOPFLASH luciferase activity in the presence of ANK3, the inhibition is only of 66% when ANK3 expression is decreased by siRNA (Figure 3B). Importantly, this effect is related to MUCDHL as silencing of ANK3 has no impact on basic or β -catenin-driven TOPFLASH luciferase activity (Supplementary Figure 1B). Thus, ANK3 promotes the activity of MUCDHL.

Loss of ANK3 decreases MUCDHL expression

To understand how ANK3 enforces the activity of MUCDHL on β -catenin, we first examined if it affects the ability of the two proteins to interact together. As shown on Figure 4A, the co-immunoprecipitation of β -catenin with MUCDHL M was indeed reduced by about 50% when ANK3 is silenced. Since the interaction of MUCDHL M with β -catenin is sufficient to decrease the transcriptional activity of β -catenin (Beck et al., in preparation), reduced interaction between both proteins may explain the lower inhibitory effect.

We hypothesized that ANK3 acts as a protein adaptor that favors the MUCDHL and β -catenin interaction and would therefore interact with both MUCDHL and β -catenin at the same time. Thus, we checked if ANK3 and β -catenin interact together in differentiated Caco-2/TC7 cells or HEK293 cells. However, in the various experimental conditions tested, we were not able

to detect any co-immunoprecipitation between both proteins (Supplementary Figure 2A and B).

Alternatively, ANK3 may enhance the inhibitory effect of MUCDHL M by stabilizing its anchorage in the plasma membrane. To investigate this hypothesis, we sought to compare by immunofluorescence the sub-cellular localization of MUCDHL in presence or absence of ANK3. Unexpectedly, Caco-2/TC7 cells transfected with siRNA against ANK3 displayed a striking decrease of MUCDHL immunostaining (Figure 4B). We confirmed by Western blot that MUCDHL protein levels are reduced upon ANK3 silencing in Caco-2/TC7 cells but also in HEK293 cells provided that only small amounts of exogenous MUCDHL are produced (Figure 4C, D). Altogether, these results suggest that the lower inhibitory effect of MUCDHL on the transcriptional activity of β -catenin is due to its decreased expression in absence of ANK3.

ANK3 regulates the stability of MUCDHL proteins

Given that ANK3 silencing led to reduced MUCDHL protein levels without any change in mRNA levels (data not shown), we hypothesized that ANK3 contributes to MUCDHL protein stability by preventing its degradation by the 26S proteasome. Hence, we observed that MUCDHL protein expression was increased when the activity of this degradation complex was blocked by a pharmacological inhibitor (MG132, Figure 5A), notably when ANK3 expression was silenced. In addition, poly-ubiquitinated forms of MUCDHL accumulated when the proteasome was blocked and this phenomenon was enhanced upon silencing of ANK3 expression (Figure 5B). Finally, we analyzed the stability of MUCDHL proteins by blocking protein synthesis (cycloheximide treatment) and found that MUCDHL is

degraded more quickly when ANK3 is not expressed (Figure 5C). Altogether these results display a mechanism whereby ANK3 stabilizes MUCDHL proteins through reduced poly-ubiquitination and degradation by the proteasome.

A specific ANK3 isoform stabilizes MUCDHL in absorptive cells of the intestinal epithelium

The ANK genes yield through alternative splicing various protein isoforms with unique functions and tissue distribution. Currently, there are five different ANK3 transcripts (*NM_001149.3*, *NM_001204403.1*; *NM_001204404.1*, *NM_001320874.1* and *NM_020987.5*) referenced in Genebank and we sought to identify which of the corresponding isoforms interacts with MUCDHL in intestinal cells. We started with a global assessment of the expression profile of the different *ANK3* transcripts along the digestive tract. We noticed that one transcript, *NM_001149.3*, exhibits an almost opposite pattern compared to the other transcripts. Indeed, while these were more expressed in the esophagus and stomach than in the intestine, the expression of the *NM_001149.3* transcript increased along the digestive tract and peaked in the gut (Figure 6A). Interestingly, MUCDHL transcripts show a very similar expression profile (Figure 6A). We also examined the expression profile of the different *ANK3* upon differentiation of Caco-2/TC7 cells. Again, the *NM_001149.3* transcript was the only one whose expression was up-regulated in differentiated cells compared to non-differentiated cells (Figure 6B). Hence, we sub-cloned the sequence of the *NM_001149.3* transcript into a mammalian expression plasmid and found that the protein produced from this transcript in transfected cells has the same molecular weight (~130 kDa)

than the main endogenous ANK3 protein in differentiated Caco-2/TC7 cells or HEK293 cells (Figure 6C).

As our results strongly suggest that the *NM_001149.3* transcript encodes a 130 kDa-ANK3 isoform in differentiated intestinal cells, we checked if this isoform was able to enhance MUCDHL M activity. Indeed, overexpression of the 130 kDa-ANK3 isoform increased the ability of MUCDHL M to interact with β -catenin and inhibit its transcriptional activity (Figure 6D, E). Altogether, these results indicate that the activity and stability of MUCDHL are regulated by a distinctive 130 kDa-ANK3 isoform expressed in mature intestinal cells.

Expression of the 130 kDa-ANK3 isoform is decreased in intestinal pathologies

Given that decreased expression of MUCDHL is involved in intestinal diseases {Hinkel, 2012 #209; Losi, 2011 #264} (Beck et al., in preparation), we wondered whether *ANK3* expression is altered in IBD or CRC. We observed that expression of the *NM_001149.3* transcript is significantly decreased in inflammatory versus non-inflammatory colon samples from IBD patients, while expression of the other *ANK3* transcripts tended to increase (Figure 7A). Likewise, there is a down-regulation of the *NM_001149.3* transcript in tumoral samples compared to normal colon samples, while the other transcripts are rather up-regulated (Figure 7B). Of note, the down-regulation of *NM_001149.3* was not due to the loss of epithelial cells or differentiation as qPCR values were expressed relative to the ones obtained for an intestinal differentiation marker (i.e. *CK20*). Thus, these results indicate that expression of the *NM_001149.3* *ANK3* transcript is decreased in pathological contexts and

suggest that through increased degradation this phenomenon might, in addition to diminished transcription, lead to lower MUCDHL protein levels.

Discussion

Compared to classical cadherins, cadherin-related proteins form a heterogeneous family whose members remain poorly known. Our study brings new information about the molecular mechanisms controlling the activity of one of these atypical cadherins, MUCDHL, which plays a unique and important role in the intestinal epithelium.

We used a two-hybrid strategy to identify proteins that interact with the cytoplasmic domain of MUCDHL and thereby mediate or regulate its activity in intestinal cells. Among the 127 positive clones singled out from the human colon library, many appeared doubtful (e.g. sequence out of frame or antisense) and only a few were predicted to interact with MUCDHL with a good confidence score. It is possible that some interactions did not occur in the yeast, notably those that require post-translational modification of proteins. In addition, the use of a nuclear LexA-MUCDHL fusion protein may also have hindered some interactions. Besides the fact that MUCDHL is a membranous protein, we have actually found that its interaction with β -catenin requires an appropriate conformation of the cytoplasmic tail (Beck et al., in preparation). Interestingly, even if additional proteins are likely to interact with MUCDHL in intestinal cells, many proteins identified through our screen relate to the actin cytoskeleton. Indeed, the positive clones included the intestinal form of actin (ACTG2), the giant protein TTN, the small GTPase RAB11A and the adapter ANK3. All these proteins are expressed in the intestinal epithelium and interact through myosin (TTN, RAB11A) or spectrin (ANK3) to the actin microfilaments {Eilertsen, 1992 #453;Peters, 1995

#452;Knowles, 2015 #296}. Given the sub-cellular localization of MUCDHL in actin-rich structures (i.e. microvilli, cellular junctions), these potential interactions appear consistent. In addition, RAB11A was previously shown to be required for the apical localization of MUCDHL in intestinal cells {Knowles, 2015 #296}.

We further studied the interaction of MUCDHL with ANK3 because this scaffold protein is believed to establish specialized membranous domains by assembling and stabilizing protein complexes made of transmembrane proteins, signaling molecules and cytoskeletal components {Cunha, 2009 #454}. In addition, ANK3 had been connected to both classical cadherins and β -catenin in previous studies {Cadwell, 2016 #456;Durak, 2015 #304;Kizhatil, 2007 #455}. Actually, ANK3, which is involved in multiple neuropsychiatric disorders (e.g. bipolar disorder, schizophrenia, autism {Cunha, 2009 #454}) and is therefore mostly studied in the nervous system, was shown to inhibit the transcriptional activity of β -catenin in neural progenitors by enhancing its membranous sequestration by E-cadherin {Durak, 2015 #304}. We were able to confirm the interaction between MUCDHL and ANK3 in intestinal cells. Furthermore, using gain / loss of function experiments, we showed that ANK3 enhances the inhibitory effect of MUCDHL on the transcriptional activity of β -catenin. As ANK3 had no impact in absence of MUCDHL, an indirect effect involving another cadherin seems unlikely. In fact, we discovered that ANK3 stabilizes MUCDHL proteins by reducing their poly-ubiquitination and degradation. Again, this effect was specific to MUCDHL as E-cadherin protein levels or sub-cellular localization were not altered upon silencing of ANK3 in intestinal cells (data not shown). Therefore, our study strengthens the idea that ANK3 is not just an inert scaffold protein but regulates the localization or level of various transmembrane proteins, namely cadherins (e.g. E-cadherin, VE-cadherin, Androgen receptor {Cadwell, 2016 #456;Kizhatil, 2007 #455;Wang, 2016 #457}). In the case of MUCDHL, the exact mechanism

involved in enhanced activity needs to be further clarified and may involve more than reducing protein degradation by the proteasome. Nevertheless, the conservation of functional properties despite structural divergences between the cadherin-related MUCDHL and the archetypal E-cadherin is intriguing on a phylogenetic perspective. Indeed, although these proteins have structurally unrelated cytoplasmic domains and fairly divergent EC repeats, their activity depends on their binding to ANK3. Whether this reflects a convergent functional evolution to fulfill critical roles or the need of fine-tuning cellular processes through different proteins is an open question {van Roy, 2014 #365}.

Another finding of this study is the fact that MUCDHL binds to a specific variant of ANK3 whose expression is induced during differentiation in intestinal cells. Although we cannot rule out the existence of additional transcripts not yet referenced in Genbank, there is a strong probability that this variant is encoded by the transcript *NM_001149.3* and corresponds therefore to the isoform 2 of ANK3. Indeed, *NM_001149.3* is the only registered ANK3 transcript that **i)** is up-regulated during differentiation, **ii)** encodes a protein with a predicted molecular weight of 110 kDa compatible with the 130 kDa signal detected by Western blot (while other ANK3 transcripts encode larger proteins of 205-480 kDa); **iii)** generates a protein of 130 kDa upon ectopic expression through plasmid transfection. Interestingly, the variant 2 of ANK3 is significantly shorter than the other ones and lacks the N-terminal ankyrin repeats. Similarly, Peters and colleagues noticed that only short ANK3 transcripts, encoding just the spectrin-binding and the regulatory domains, are detected in the mouse intestine {Peters, 1995 #452}. Our own data indicate that expression of this short isoform of ANK3 accompanies and probably supports the maturation of absorptive intestinal cells. Furthermore, we showed for the first time that expression of this short transcript of *ANK3* is decreased in intestinal pathologies, i.e. colon cancer and IBD. This may contribute to

the loss of MUCDHL expression that was observed in these diseases by previous studies {Losi, 2011 #264}. A few reports had already hinted at a dysregulation of *ANK3* in cancer, showing the occurrence of frameshift mutations or the use of alternative transcription start sites in colorectal cancer samples {Thorsen, 2011 #459;Yeon, 2018 #460}. The loss of *ANK3* has also been a part of a 11-gene signature predicting therapy failure and fatal outcome in various types of cancer that may be linked to increased survival and stemness of cancer cells {Glinsky, 2005 #461;Kumar, 2011 #203}. Thus, beyond the regulation of MUCDHL stability, this study reinforces the interest of studying the role of *ANK3* and its various isoforms in the context of cancer.

Acknowledgments

We thank Drs. M. Rousset, and H. Clevers for reagents.

References

1. Hulpiau P, van Roy F. Molecular evolution of the cadherin superfamily. *Int J Biochem Cell Biol* 2009;41:349-69.
2. Goldberg M, Wei M, Tycko B, et al. Identification and expression analysis of the human mu-protocadherin gene in fetal and adult kidneys. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002;283:F454-63.
3. Moulton DE, Crandall W, Lakhani R, et al. Expression of a novel cadherin in the mouse and human intestine. *Pediatr Res* 2004;55:927-34.
4. Hinkel I, Duluc I, Martin E, et al. Cdx2 controls expression of the protocadherin *Mucdhl*, an inhibitor of growth and beta-catenin activity in colon cancer cells. *Gastroenterology* 2012;142:875-885 e3.
5. Goldberg M, Peshkovsky C, Shifteh A, et al. μ -Protocadherin, a novel developmentally regulated protocadherin with Mucin-like domains. *J Biol Chem* 2000;275:24622–24629. ^[1]_{ISEP}

6. Crawley SW, Shifrin DA, Jr., Grega-Larson NE, et al. Intestinal brush border assembly driven by protocadherin-based intermicrovillar adhesion. *Cell* 2014;157:433-46.
7. Knowles BC, Weis VG, Yu S, et al. Rab11a regulates syntaxin 3 localization and microvillus assembly in enterocytes. *J Cell Sci* 2015;128:1617-26.
8. Bujko M, Kober P, Statkiewicz M, et al. Epigenetic-mediated downregulation of mu-protocadherin in colorectal tumours. *Gastroenterol Res Pract* 2015;2015:317093.
9. VanDussen KL, Stojmirovic A, Li K, et al. Abnormal small intestinal epithelial microvilli in patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 2018;155:815-828.
10. Losi L, Parenti S, Ferrarini F, et al. Down-regulation of mu-protocadherin expression is a common event in colorectal carcinogenesis. *Hum Pathol* 2011;42:960-71.
11. Beck M, Baranger M, Moufok-Sadoun A, et al. The atypical cadherin MUCDHL antagonizes colon cancer and inhibits β -catenin signaling through multiple mechanisms. In preparation.
12. Parenti S, Ferrarini F, Zini R, et al. Mesalazine inhibits the beta-catenin signalling pathway acting through the upregulation of mu-protocadherin gene in colo-rectal cancer cells. *Aliment Pharmacol Ther* 2010;31:108-19. ^[1]_{SEP}
13. Mege RM, Ishiyama N. Integration of cadherin adhesion and cytoskeleton at adherens Junctions. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2017;9.
14. Novellasdemunt L, Antas P, Li VS. Targeting Wnt signaling in colorectal cancer. A Review in the Theme: Cell Signaling: Proteins, Pathways and Mechanisms. *Am J Physiol Cell Physiol* 2015;309:C511-21.
15. Kolligs FT, Hu G, Dang CV, et al. Neoplastic transformation of RK3E by mutant beta-catenin requires deregulation of Tcf/Lef transcription but not activation of c-myc expression. *Mol Cell Biol* 1999;19:5696-706.
16. 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;27:107-15.
17. Platet N, Hinkel I, Richert L, et al. The tumor suppressor CDX2 opposes pro-metastatic biochemical modifications of colon cancer cells through organization of the actin cytoskeleton. *Cancer Lett* 2017;386:57-64.
18. Cunha SR., Mohler, PJ. Ankyrin protein networks in membrane formation and stabilization. *J Cell Mol Med* 2009;13:4364-4376.
19. 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(Pt 1):213-25.
20. Huels DJ, Ridgway RA, Radulescu S, et al. E-cadherin can limit the transforming properties of activating beta-catenin mutations. *EMBO J* 2015;34:2321-33.
21. Korinek V, Barker N, Morin PJ, et al. Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC^{-/-} colon carcinoma. *Science* 1997;275:1784-7.
22. Eilertsen KJ, Keller TC. Identification and characterization of two huge protein components of the brush border cytoskeleton: evidence for a cellular isoform of titin. *J Cell Biol* 1992;119:549-57.
23. Peters LL, Lu FM, Eicher EM, et al. Ank 3 (epithelial ankyrin), a widely distributed new member of the ankyrin gene family and the major ankyrin in kidney, is expressed in alternatively spliced forms, including forms that lack the repeat domain. *J Bio Chem* 1995;30:313-330.

24. Cadwell CM, Jenkins PM, Bennett V et al. Ankyrin-G inhibits endocytosis of cadherin dimers. *J Biol Chem* 2016;291:691-704.
25. Durak O, de Anda FC, Singh KK, et al. Ankyrin-G regulates neurogenesis and Wnt signaling by altering the subcellular localization of β -catenin. *Mol Psychiatry* 2015;20:1-10.
26. Kizhatil K, Davis JQ, Davis L, et al. Ankyrin-G is a molecular partner of E-cadherin in epithelial cells and early embryos. *J. Bio. Chem.* 2007;282:26552-26561.
27. Wang T, Abou-Ouf H, Hegazy SA, et al. Ankyrin G expression is associated with androgen receptor stability, invasiveness, and lethal outcome in prostate cancer patients. *J Mol Med* 2016;94:1411-1422.
28. van Roy F. Beyond E-cadherin: roles of other cadherin superfamily members in cancer. *Nat Rev Cancer* 2014;14:121-34.
29. Thorsen K, Schepeler T, Øster B, et al. Tumor-specific usage of alternative transcription start sites in colorectal cancer identified by genome-wide exon array analysis. *BMC Genomics* 2011;12:505.
30. Yeon SY, Jo YS, Choi EJ, et al. Frameshift mutations in repeat sequences of ANK3, HACD4, TCP10L, TP53BP1, MFN1, LCMT2, RNMT, TRMT6, METTL8 and METTL16 genes in colon cancers. *Pathol Oncol Res* 2018 ; 24 :617-622.
31. Glinsky GV, Berezovska O, Glinskii AB. Microarray analysis identifies a death-from cancer signature predicting therapy failure in patients with multiple types of cancer. *J Cell Invest* 2005;15:1503-1521.
32. Kumar S, Park SH, Cieply B, et al. A pathway for the control of anoikis sensitivity by E-cadherin and epithelial-to-mesenchymal transition. *Mol Cell Biol* 2011;31:4036-51.

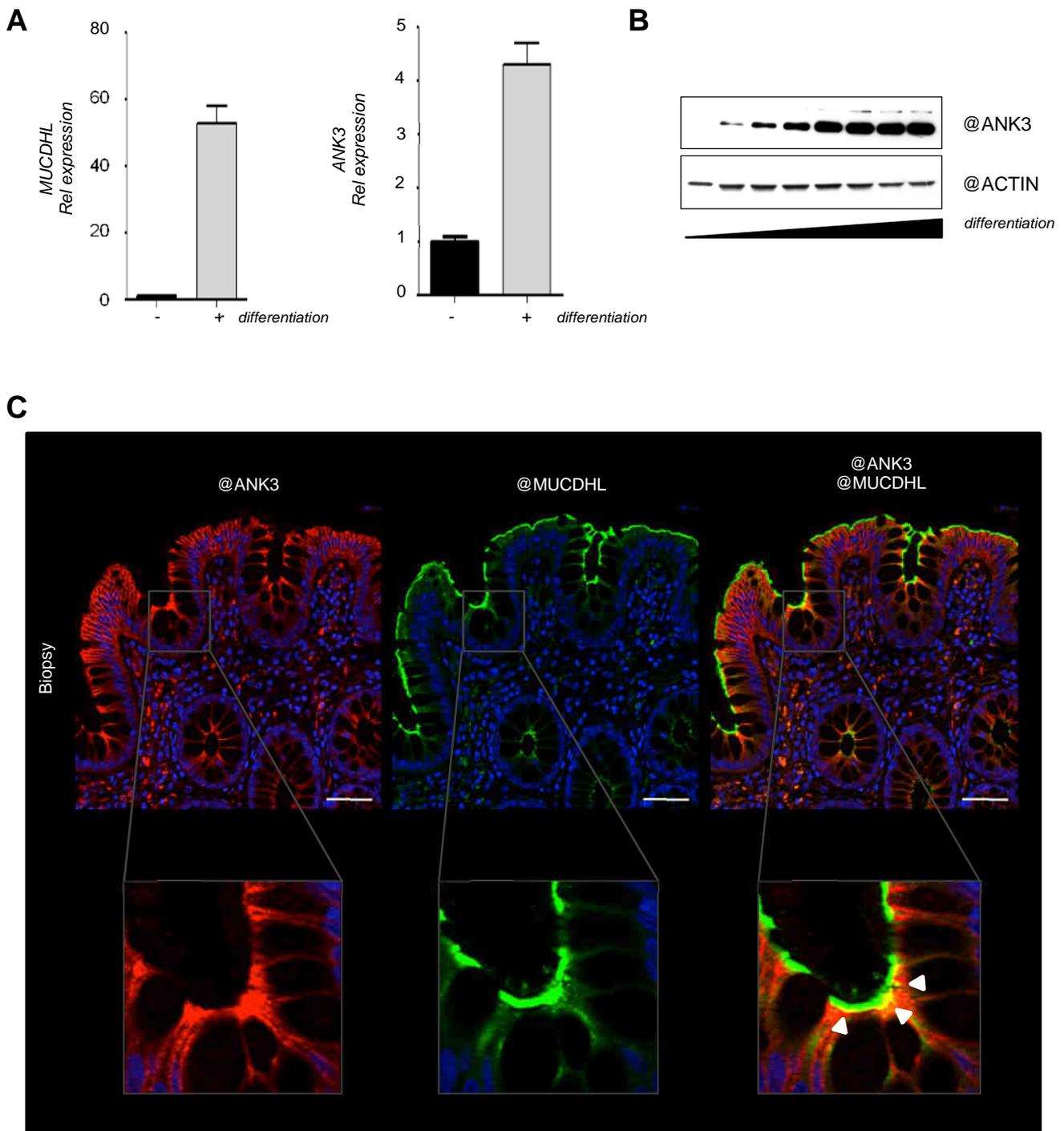


Figure 1. MUCDHL and ANK3 are co-expressed in intestinal differentiated cells

(A) Relative mRNA expressions of *ANK3* and *MUCDHL* were determined by RT-qPCR in Caco-2/TC7 cells grown up 2 days (non-differentiated) or 17 days (differentiated). Ct values were normalized with *TBP* expression and the relative expression was calculated compared to Caco-2/TC7 at 2 days. The error bars correspond to the limits of the 95% confidence interval of duplicates. (B) Cells were grown up for 3 days to 24 days before lysis and proteins in bulk lysates were separated by SDS-PAGE and detected by Western blot using the indicated antibodies (@). (C) Human colon biopsies were labeled with antibodies staining ANK3 (red fluorescence) and MUCDHL (green fluorescence). Co-localization of both proteins was assessed, evaluating the presence of a merged fluorescence signal (yellow fluorescence). Scale bar, 50 μ m.

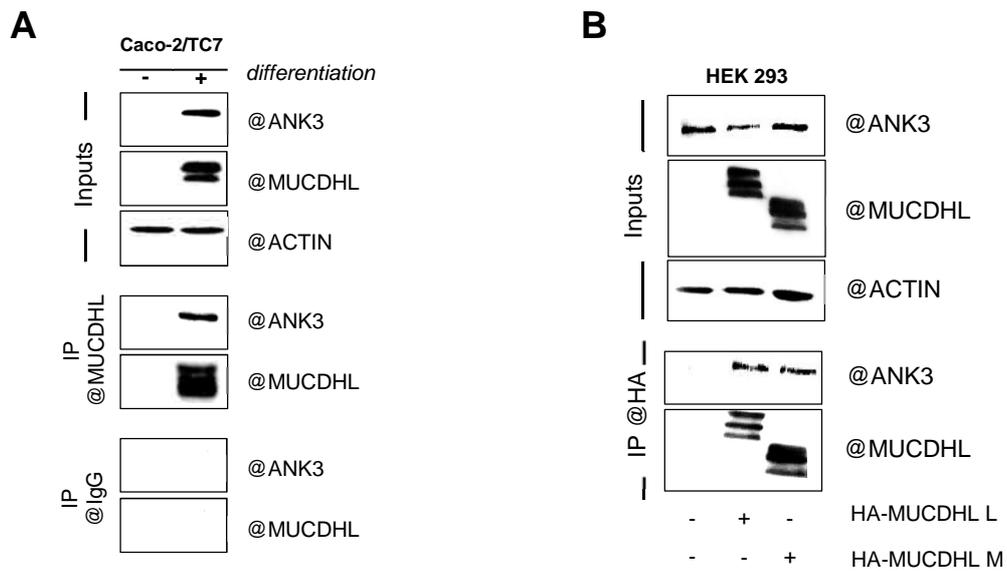


Figure 2. MUCDHL interacts with ANK3

(A) Caco-2/TC7 cells were grown for 3 (-) or 24 (+) days to allow spontaneous differentiation before lysis and immunoprecipitation (IP) with either control (IgG) or MUCDHL antibody. Inputs (1%) and immunoprecipitates were analyzed by immunoblotting with the indicated antibodies (@). (B) HEK293 cells were transfected with the indicated HA-MUCDHL-expressing plasmid or the corresponding empty plasmid (-), before protein extraction and immunoprecipitation (IP) with an anti-HA antibody. Proteins in bulk lysates (inputs, 1%) and immunoprecipitates were separated by SDS-PAGE and detected by Western blot using the indicated antibodies (@).

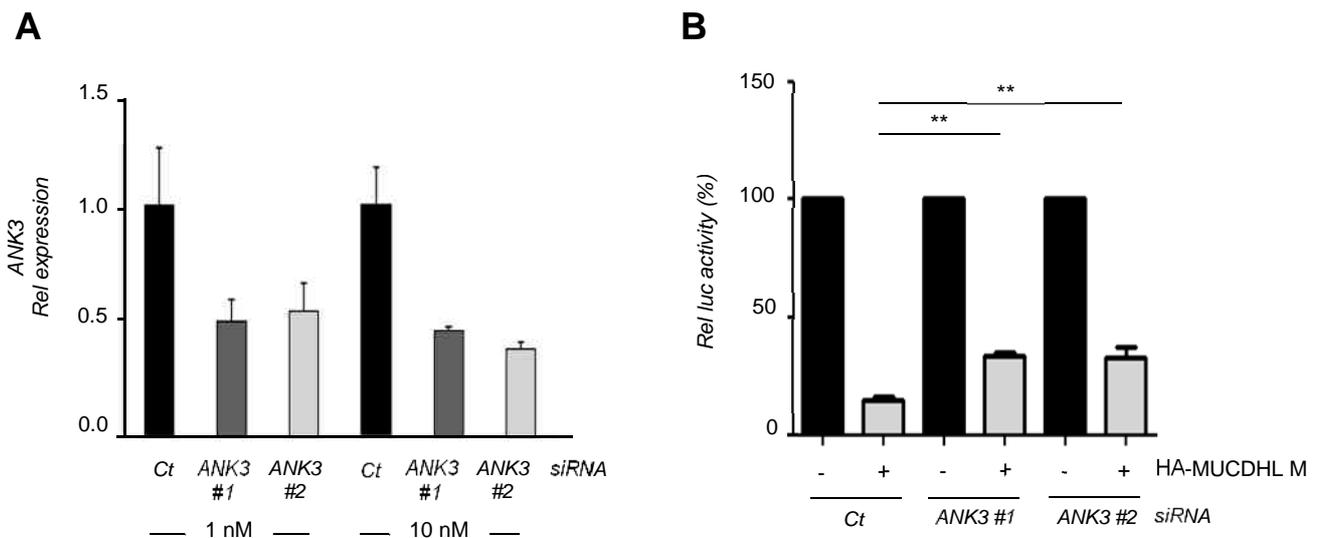


Figure 3. ANK3 contributes to MUCDHL activity

(A) HEK293 cells were transfected with siRNA *Control* (Ct) or siRNA *ANK3#1* (ANK3#1368), or siRNA *ANK3#2* (ANK3#1370) at final concentrations of 1 nM or 10 nM for 2 days. Relative mRNA expression of *ANK3* was determined by RT-qPCR and Ct values were normalized with *TBP* expression. The relative expression was calculated compared to siRNA *Control*. The error bars correspond to the limits of the 95% confidence interval of duplicates. (B) HEK293 cells were transfected with siRNA *Control*, or siRNA *ANK3#1* (ANK3#1368), or siRNA *ANK3#2* (ANK3#1370), and also with MUCDHL M or the corresponding empty plasmid (-), β -catenin S33Y and TCF4-expressing plasmids (+), the TopFlash reporter plasmid and a promoter-less Renilla reporter plasmid (internal control) before lysis and luminescence measurement. Relative promoter activity (-/+ SD, normalized with Renilla values) of the TopFlash reporter in the absence of MUCDHL M (-) was set at 100%. Data correspond to the mean of 3-4 independent experiments performed in triplicate (** $p < 0.01$, using a one-way ANOVA followed by a Tuckey post-test).

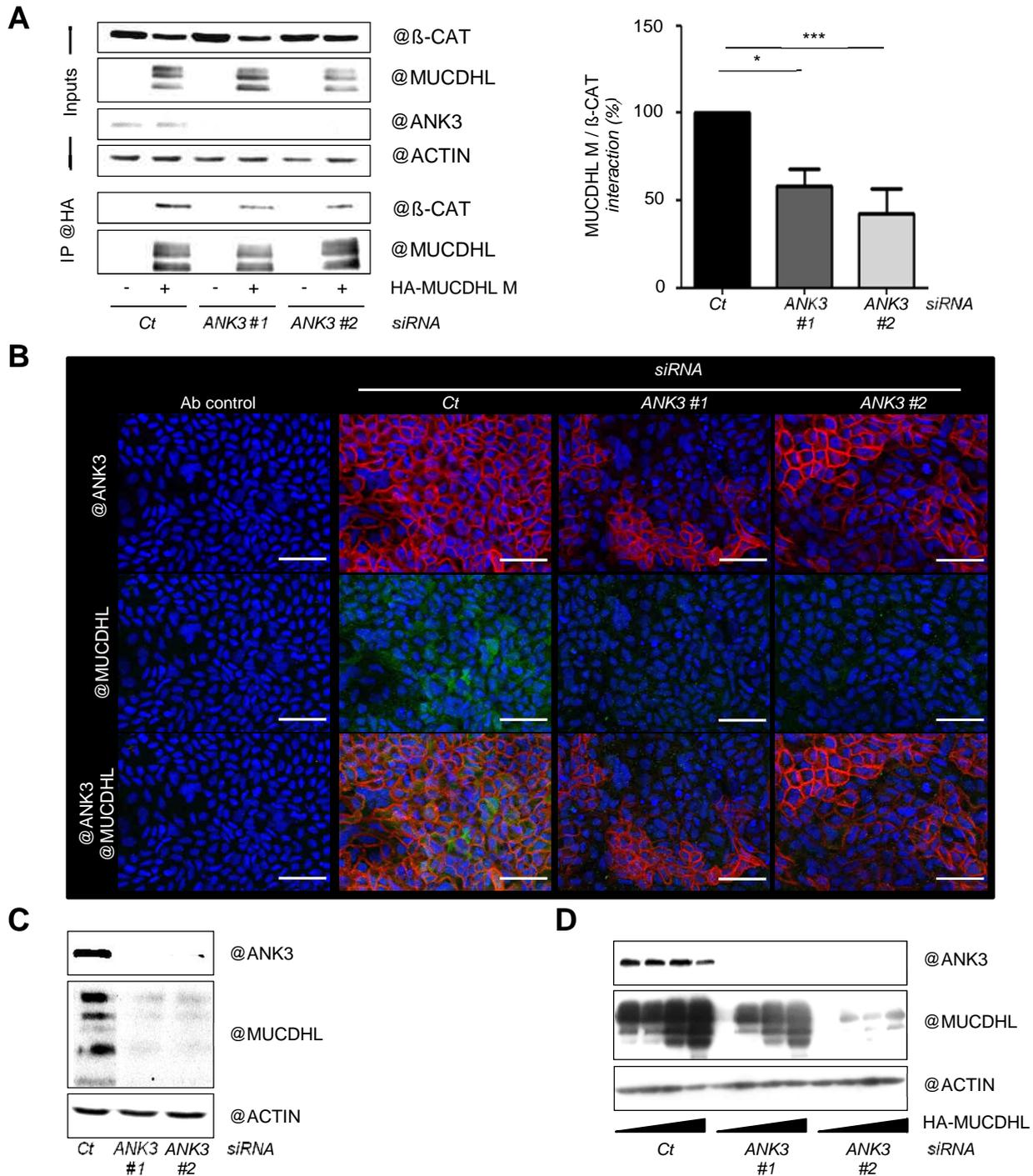


Figure 4. Loss of ANK3 decreases MUCDHL expression

(A) HEK293 cells were transfected with FLAG-β-catenin S33Y, HA-MUCDHL M plasmids and siRNA *Control*, or siRNA *ANK3#1* (*ANK3#1368*), or siRNA *ANK3#2* (*ANK3#1370*), before protein extraction and immunoprecipitation (IP) with an anti-HA antibody. Proteins in bulk lysates (inputs, 1%) and immunoprecipitates were separated by SDS-PAGE and detected by Western blot using the indicated antibodies (@). A representative blot is displayed on the left and the quantification of 3 independent experiments is shown on the right. The relative amount of immunoprecipitated β-catenin (normalized with β-catenin (inputs) and Actin signals) was set at 100% for each condition (* $p < 0.5$; *** $p < 0.001$, using a one-way ANOVA test followed by a Tuckey post-test). (B) Caco-2/TC7 colon carcinoma cells were transfected at high density with siRNA *Control*, or siRNA *ANK3#1* (*ANK3#1368*), or siRNA *ANK3#2* (*ANK3#1370*), and cultured for about 20 days to allow spontaneous differentiation. Proteins were labeled with antibodies staining ANK3 (red fluorescence) and MUCDHL (green fluorescence). Scale bar, 50 μm. (C) Same as in (B) with Western blot analysis. (D) Increasing amounts of MUCDHL (50, 150, 300, 600 ng) were transfected into HEK293 cells +/- siRNA *Control*, or siRNA *ANK3#1* (*ANK3#1368*), or siRNA *ANK3#2* (*ANK3#1370*). Proteins in bulk lysates were detected by Western blot using the indicated antibodies (@).

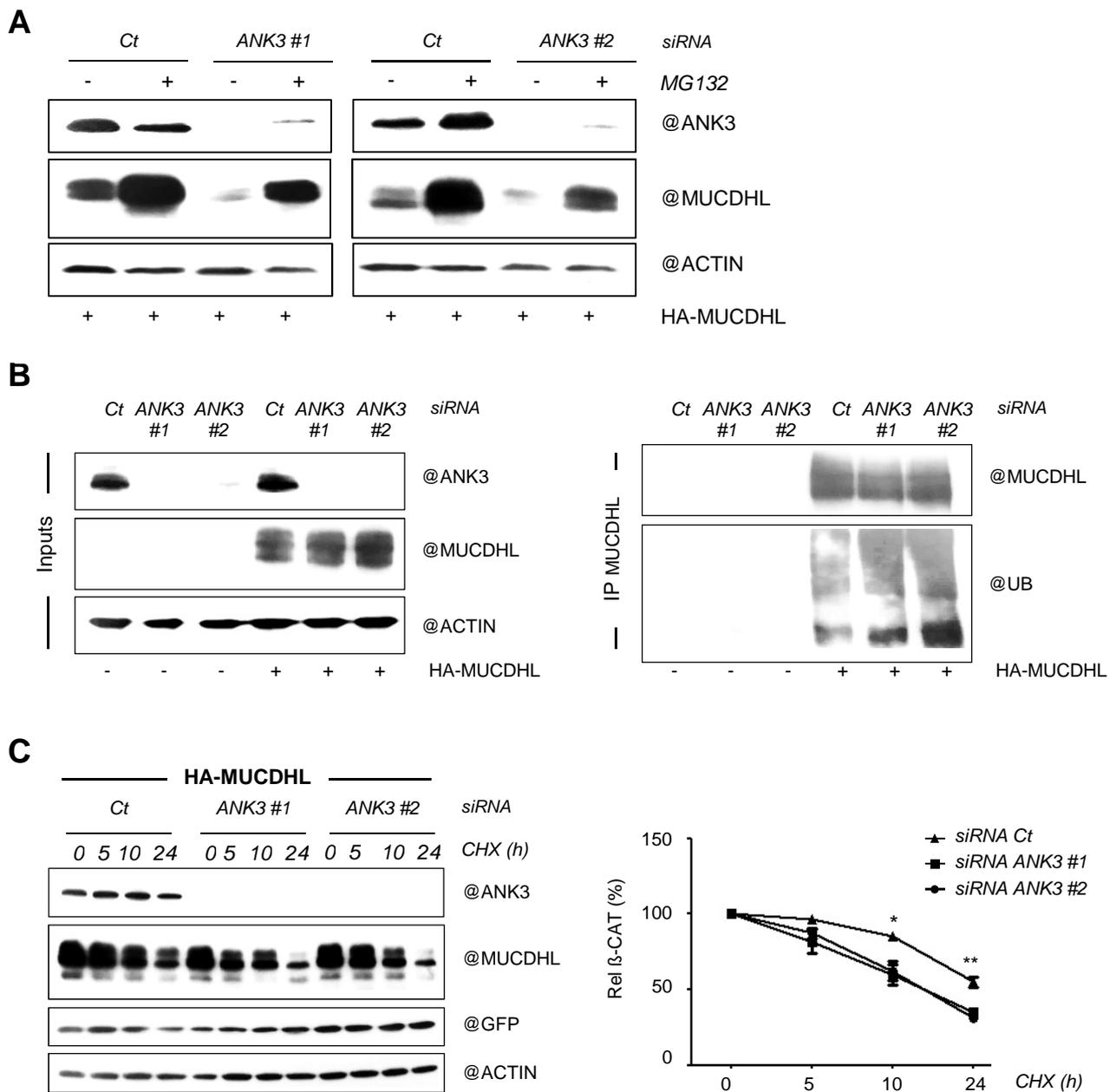
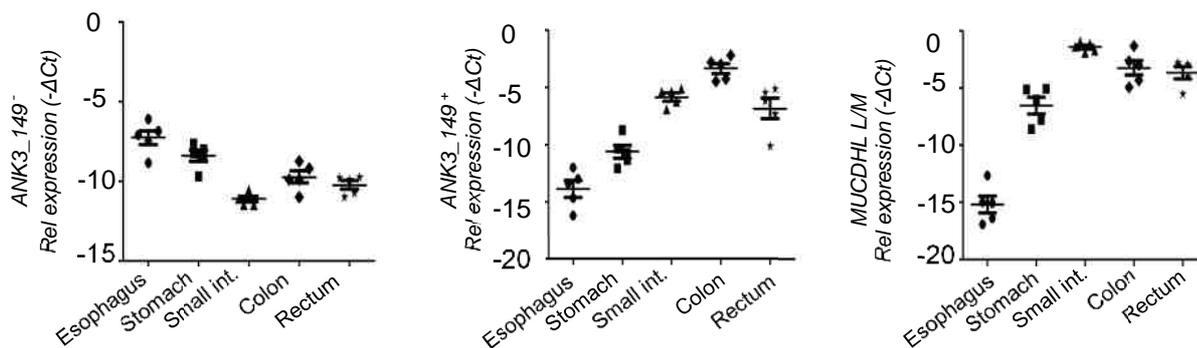


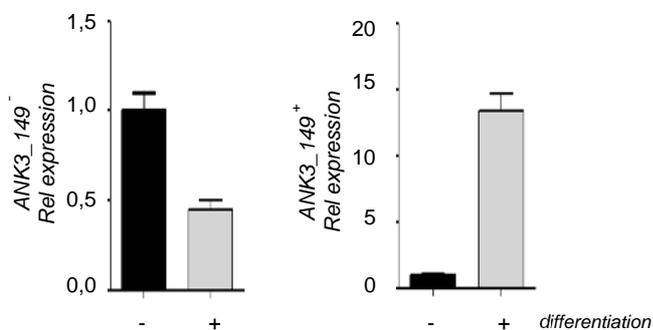
Figure 5. ANK3 regulates the stability of MUCDHL

(A) HEK293 cells were transfected with siRNA (Control, or ANK3#1368 (ANK3#1), or ANK3#1370 (ANK3#2), a plasmid expressing HA-MUCDHL M or an empty vector (-) and treated or not with MG132 (10 μ M) overnight before protein extraction and Western blot analysis. (B) HEK293 cells were transfected as above and treated with MG132 (10 μ M) overnight before protein extraction and immunoprecipitation (IP) with a MUCDHL antibody. Proteins in bulk lysates (inputs, 1%) and immunoprecipitates were separated by SDS-PAGE and detected by Western blot using the indicated antibodies (@). The smear observed with the anti-ubiquitin antibody (UB) is typical of poly-ubiquitination. (C) HEK293 were transfected in the same conditions as before and treated or not (0) with cycloheximide (CHX, 100 μ g/ml) for 5, 10 or 24h before lysis and analysis of extracts by Western blot. A representative blot is displayed on the left and the quantification of 3 independent experiments is shown on the right. The relative amount of MUCDHL (normalized with GFP and Actin signals) without cycloheximide was set at 100% for each condition (* $p < 0.5$; ** $p < 0.01$, using a one-way ANOVA test followed by a Tuckey post-test).

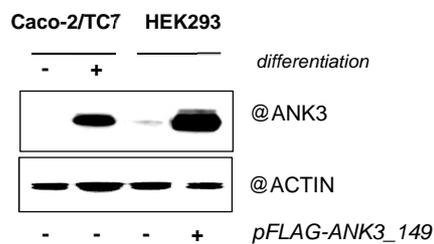
A



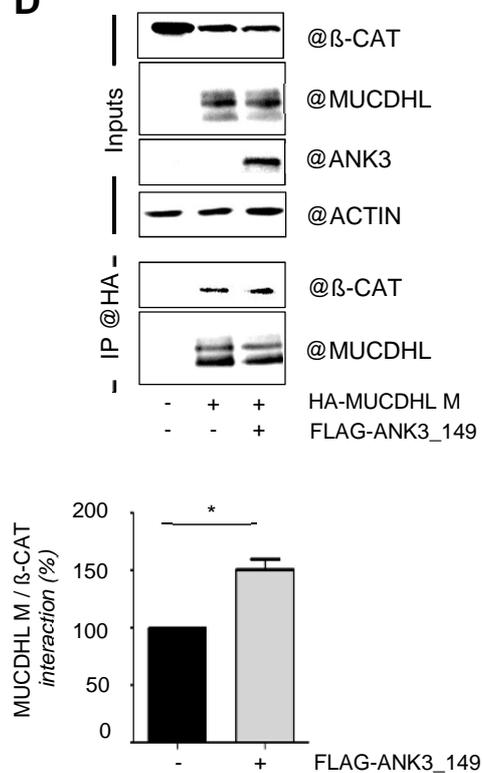
B



C



D



E

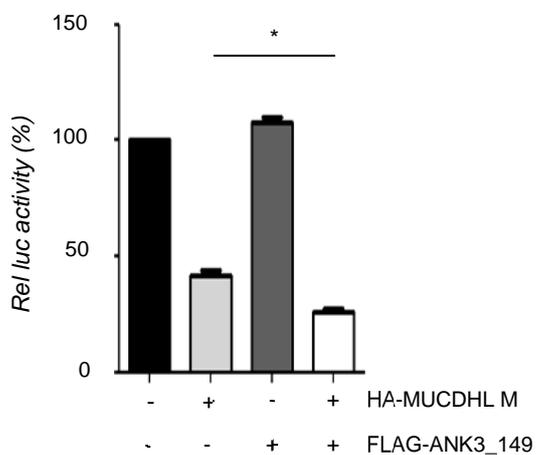
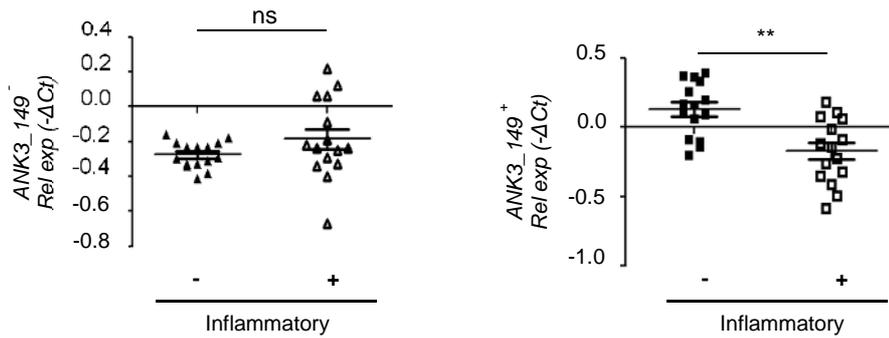
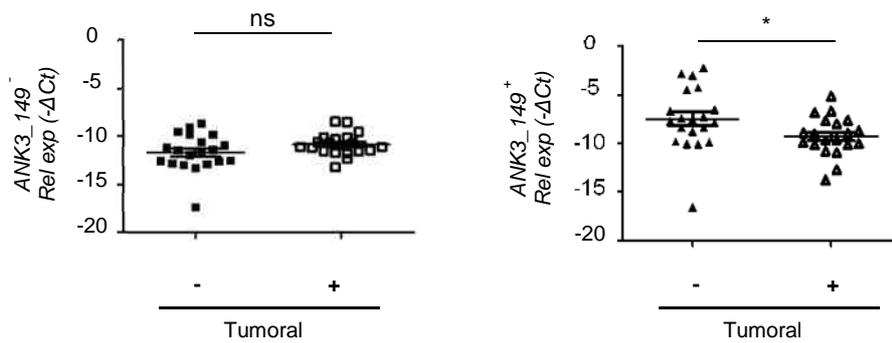
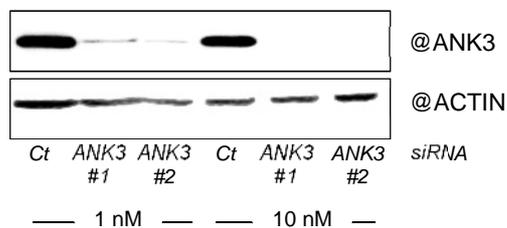
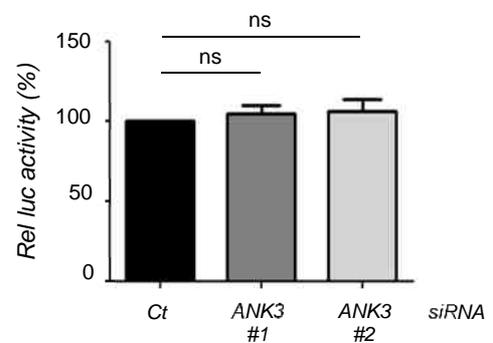


Figure 6. A specific ANK3 isoform enhances MUCDHL activity in intestinal cells

(A) Relative human mRNA expression of ANK3_149⁻ (NM_001204403.1, NM_001204404.1, NM_001320874.1 and NM_020987.5), ANK3_149⁺ (NM_001149.3) and MUCDHL were determined by RT-qPCR along the digestive tract and normalized with β -2-M expression (n=5). (B) Relative mRNA expressions of ANK3_149⁻ (NM_001204403.1, NM_001204404.1, NM_001320874.1 and NM_020987.5) and ANK3_149⁺ (NM_001149.3) were determined by RT-qPCR in Caco-2/TC7 cells grown for 2 (-) or 17 (+) days. Ct values were normalized with TBP expression and the relative expression was calculated compared to Caco-2/TC7 2 days. The error bars correspond to the limits of the 95% confidence interval of duplicates. (C) Proteins were extracted either from Caco-2/TC7 cells, undifferentiated (-, 2 days) and differentiated (+, 17 days), or from HEK293 cells transfected (+) or not (-) with a FLAG-ANK3_149-expressing plasmid. Proteins in bulk lysates were separated by SDS-PAGE and detected by Western blot using the indicated antibodies (@). (D) HEK293 cells were transfected with FLAG- β -catenin S33Y, HA-MUCDHL M, ANK3_149 plasmids, before protein extraction and immunoprecipitation (IP) with an anti-HA antibody. Proteins in bulk lysates (inputs, 1%) and immunoprecipitates were separated by SDS-PAGE and detected by Western blot using the indicated antibodies (@). A representative blot is displayed at the top and the quantification of 3 independent experiments is shown at the bottom. The relative amount of immunoprecipitated β -catenin (normalized with β -catenin (inputs) and Actin signals) was set at 100% for each condition (* $p < 0.5$; *** $p < 0.001$, using one-way ANOVA test followed by a Tuckey post-test). (E) HEK293 cells were transfected with MUCDHL M or the corresponding empty plasmid (-), β -catenin S33Y and TCF4-expressing plasmids (+), the TopFlash reporter plasmid, a promoter-less Renilla reporter plasmid (internal control), and FLAG-ANK3_149-expressing plasmid or the corresponding empty plasmid (-), before lysis and luminescence measurement. Relative promoter activity (-/+ SD, normalized with Renilla values) of the TopFlash reporter in the absence of MUCDHL M (-) was set at 100%. Data correspond to the mean of 3-4 independent experiments performed in triplicate (* $p < 0.5$, using a one-way ANOVA followed by a Tuckey post-test).

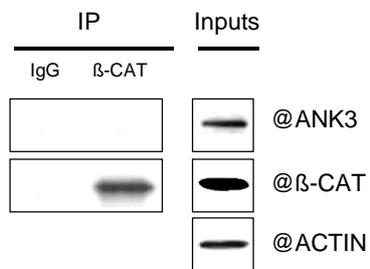
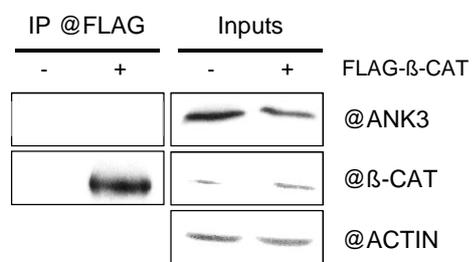
A**B****Figure 7. ANK3_149 is decreased in intestinal pathologies like MUCDHL**

Relative human mRNA expression of ANK3_149⁻ (NM_001204403.1, NM_001204404.1, NM_001320874.1 and NM_020987.5); and ANK3_149⁺ (NM_001149.3) were determined by RT-qPCR in either inflammatory bowel diseases or colorectal cancers. (A) Non-inflammatory (-) and inflammatory (+) colon biopsies were compared and values were normalized with CK20 and TBP expression (n=15); (B) Non-tumoral (-) and tumoral (+) colon biopsies were compared and values were normalized with CK20 and β-2-M expression (n=20). (* p < 0.05; ** p < 0.01, using a Mann-Whitney Test).

A**B**

Sup Figure 1. Efficiency and lack of impact without MUCDHL of ANK3 siRNA

(A) HEK293 cells were transfected with siRNA *Control*, or siRNA *ANK3#1* (*ANK3#1368*), or siRNA *ANK3#2* (*ANK3#1370*) at final concentrations of 1 nM or 10 nM for 2 days before lysis. Proteins in bulk lysates were separated by SDS-PAGE and detected by Western blot using the indicated antibodies (@). (B) HEK293 cells were transfected with siRNA *Control*, or siRNA *ANK3#1* (*ANK3#1368*), or siRNA *ANK3#2* (*ANK3#1370*), and also with β -catenin S33Y and TCF4-expressing plasmids (+), the TopFlash reporter plasmid and a promoter-less Renilla reporter plasmid (internal control) before lysis and luminescence measurement. Relative promoter activity (-/+ SD, normalized with Renilla values) of the TopFlash reporter with siRNA *Control* was set at 100%. Data correspond to the mean of 3-4 independent experiments performed in triplicate (ns, non-significant difference, using a one-way ANOVA followed by a Tuckey post-test).

A**B****Sup Figure 2. ANK3 does not seem to interact with β-catenin in Caco-2/TC7 and HEK293 cells**

(A) Caco-2/TC7 colon carcinoma cells were grown for about 20 days to allow spontaneous differentiation before lysis and immunoprecipitation with either control (IgG) or β-catenin antibody. (B) HEK293 cells were transfected with the indicated FLAG-β-catenin-expressing plasmid or the corresponding empty plasmid (-), before protein extraction and immunoprecipitation (IP) with an anti-FLAG antibody. For (A) and (B) proteins in bulk lysates (inputs, 1%) and immunoprecipitates were separated by SDS-PAGE and detected by Western blot using the indicated antibodies (@).

DISCUSSION

Discussion

I - Discussion générale et perspectives

La famille des gènes apparentés aux Cadhérines à laquelle appartient MUCDHL regroupe des Cadhérines atypiques de structures variées qui sont pour la plupart assez mal connues. Elles se distinguent des Cadhérines classiques par leurs particularités structurales et leur origine phylogénétique (van Roy., 2014). Il semblerait que MUCDHL joue un rôle original et important dans l'homéostasie intestinale, et que son expression soit diminuée dans les pathologies digestives telles que les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin et les cancers colorectaux (Crawley *et al.*, 2014 ; Losi *et al.*, 2011). Toutefois, le mode d'action de MUCDHL a été encore peu étudié et reste mal compris à ce jour. Ainsi, mes travaux de thèse visaient à comprendre comment MUCDHL s'oppose à la progression tumorale, en décryptant les mécanismes moléculaires et cellulaires mis en jeu par MUCDHL et en identifiant de nouveaux interactants pouvant être des régulateurs et/ou des effecteurs de MUCDHL.

1. Expression de MUCDHL lors de la cancérogenèse colique

Plusieurs études antérieures avaient indiqué une baisse d'expression de *MUCDHL* dans de petites cohortes de CCR (N < 30) (Losi *et al.*, 2011 ; Hinkel *et al.*, 2012 ; Bujko *et al.*, 2015). Ainsi, l'étude d'une plus grande cohorte de patients (N > 500), atteints exclusivement de cancer du côlon, nous a permis de confirmer avec plus de certitude que l'expression de *MUCDHL* est réduite dans la plupart des tumeurs coliques humaines. De plus, notre étude indique que la diminution de *MUCDHL* est plus importante dans le sous-type moléculaire C4. De manière intéressante, ce sous-type C4, qui correspond au sous-type CMS4 dans la nouvelle classification (Guinney *et al.*, 2015), est caractérisé par un phénotype de « cellule souche cancéreuse » ou « mesenchymal » cohérent avec une forte baisse de *MUCDHL* qui est uniquement exprimé dans les cellules différenciées de l'épithélium colique sain. En outre, le sous-type moléculaire C4 montre également une forte baisse de l'expression de *CDX2* et une activation constitutive de la voie WNT/ β -caténine (Marisa *et al.*, 2013 ; Balbinot *et al.*, 2018). *CDX2* et la β -caténine étant impliqués dans le contrôle de l'expression de *MUCDHL* (Hinkel *et*

Discussion

al., 2012 ; Montorsi *et al.*, 2016), il est donc possible que la diminution de l'expression de *MUCDHL* dans les tumeurs du côlon ne soit pas uniquement due à une hyperméthylation de son promoteur (Bujko *et al.*, 2015), mais également à des dérégulations transcriptionnelles, comme c'est le cas pour l'E-cadhérine (Berx & van Roy., 2009). Pour confirmer cette hypothèse, des analyses statistiques de corrélation (ex. Pearson) devraient être effectuées, en comparant par exemple l'expression de *MUCDHL* et de *CDX2* dans les tumeurs de façon globale, voire par tumeur. Par ailleurs, mes résultats indiquent que l'expression de *MUCDHL* est également régulée au niveau post-traductionnel et pourrait être diminuée par une dégradation accrue en absence d'ANK3_149 dans les tumeurs coliques (*cf* § 3.2). Toutefois, une analyse dédiée, visant à mettre en évidence une corrélation spécifique (hors baisse des transcrits *MUCDHL*) entre l'expression des transcrits *ANK3_149* (pas d'anticorps spécifique) et les niveaux protéiques de *MUCDHL*, serait nécessaire pour confirmer ce mécanisme chez les patients.

2. Conséquences de la perte d'expression de *MUCDHL* pour la cancérogenèse colique

2.1 Aspects physiopathologiques

De façon intéressante, le sous-type moléculaire C4 est également celui qui a le plus mauvais pronostic et ses tumeurs sont considérées comme étant "à haut risque" par le score de récurrence Oncotype DX (O'Connell *et al.*, 2010). De plus, nos résultats montrent pour la première fois que les patients ayant une expression très faible de *MUCDHL* ont une survie globale réduite (- 15 % à 5 ans et - 25 % à 10 ans) par rapport à ceux qui maintiennent un certain niveau d'expression de *MUCDHL*. Cette baisse de la survie en fonction de l'expression de *MUCDHL* est plus marquée dans le sous-type moléculaire C5 (- 20 % à 5 ans et - 30 % à 10 ans) dont les tumeurs présentent également une baisse d'expression importante de *MUCDHL*. De plus, ce sous-type C5 est aussi caractérisé par une hyperactivation de la voie WNT/ β -

Discussion

caténine (Marisa *et al.*, 2013) et correspond au sous-type CMS2 dit « canonique » dans la nouvelle classification (Guinney *et al.*, 2015).

Ces résultats issus de patients ont été confortés par l'analyse d'un modèle de souris génétiquement invalidées au niveau du locus *Mucdhl*. Ces souris sont viables, mais présentent des altérations morphologiques et fonctionnelles au niveau intestinal. En effet, en accord avec la fonction d'adhésion intermicrovillositaire de MUCDHL proposée par Crawley *et al.* (Crawley *et al.*, 2014), nous avons observé que l'absence de MUCDHL chez ces souris entraîne des anomalies au niveau des microvillosités qui sont moins nombreuses, plus courtes et/ou mal insérées. Ces altérations au niveau de la bordure en brosse corrént avec une augmentation de la perméabilité transcellulaire et une diarrhée chronique (Bersuder *et al.*, en préparation^b). Toutefois, comme pour CDX2 (Bonhomme *et al.*, 2003), la perte de MUCDHL chez la souris ne suffit pas à induire le développement de tumeurs coliques. En revanche, nous avons montré que l'absence d'expression de MUCDHL dans un contexte pro-oncogénique lié à la perte du gène *Apc* favorise (i.e. augmentation fréquence) et amplifie (i.e. nombre et taille des tumeurs) le développement tumoral. Il serait pertinent de vérifier si la perte de MUCDHL a un impact similaire dans d'autres modèles murins de cancérogenèse, tels que le modèle AOM (i.e. carcinogène chimique) ou, comme l'expression de MUCDHL joue un rôle dans l'inflammation (Bersuder *et al.*, en préparation^b), le modèle AOM/DSS (i.e. carcinogène chimique et colite). En tout état de cause, les résultats obtenus dans cette étude avec le modèle de perte de fonction de *Apc* et les échantillons de patients montrent pour la première fois que la perte de MUCDHL est un événement défavorable au cours de la tumorigenèse intestinale.

Par la suite, il sera intéressant d'étudier l'impact de la perte de MUCDHL sur d'autres aspects cliniques que la survie. Par exemple, les corrélations entre la baisse d'expression de MUCDHL et le stade TNM, le risque de récidence ou la réponse au traitement pourront être examinées et, en fonction des résultats obtenus, ces études pourront être approfondies dans un cadre translationnel (e.g. marqueur pronostique ?).

Discussion

2.2 Aspects cellulaires et moléculaires

Si les résultats obtenus confirment que MUCDHL agit comme un suppresseur de tumeur dans l'épithélium intestinal, comme suggéré initialement par la croissance réduite des tumeurs exprimant MUCDHL chez la souris nude (Hinkel *et al.*, 2012), ils n'apportent, à ce stade, que peu de nouvelles informations sur les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans son activité anti-tumorale *in vivo*. En effet, l'analyse histologique des tumeurs formées chez les souris *Apc*^{Δ14/+}; *Mucdhl*^{+/+} et *Apc*^{Δ14/+}; *Mucdhl*^{-/-} n'a pas permis de détecter des différences de grade ou d'agressivité, la plupart des tumeurs formées ayant un degré de différenciation hétérogène et restant confinées dans le chorion. Ainsi, même si la perte de *MUCDHL* ne suffit pas à elle seule à initier la tumorigenèse, il est probable qu'elle impacte plutôt les étapes précoces de formation et de croissance de la tumeur que sa progression. Cette hypothèse est confortée par deux autres observations : **i)** l'expression de MUCDHL est déjà diminuée dans les polypes intestinaux chez l'homme (Bujko *et al.*, 2015) ; **ii)** les souris *Apc*^{Δ14/+}; *Mucdhl*^{-/-} ont plus de tumeurs de grande taille que les souris *Apc*^{Δ14/+}; *Mucdhl*^{+/+}. Ces résultats sont un peu surprenants car, s'il est largement admis que la perte de marqueurs de différenciation et de molécules d'adhésion au cours de la progression tumorale facilite le processus métastatique, ses conséquences aux stades précoces de la formation de la tumeur sont plus controversées. Cependant, des caractéristiques épithéliales telles que la polarité apico-basale ou l'adhésion sont mécaniquement liées à la prolifération et à la survie des cellules (Martin-Belmonte & Perez-Moreno, 2012). De plus, la validité d'un modèle "Topdown" de formation d'adénomes (Shih *et al.*, 2001) par dédifférenciation des cellules intestinales a été démontrée chez la souris (Schwitalla *et al.*, 2013). Dans le cas de MUCDHL, l'analyse de la prolifération cellulaire et de l'apoptose au sein des tumeurs n'a pas révélé de différence entre les deux génotypes et ce bien que nous ayons détecté un peu plus de prolifération par marquage BrdU⁺ dans l'épithélium intestinal des souris *Mucdhl*^{-/-} par rapport aux souris *Mucdhl*^{+/+}. Il faut cependant noter que les marquages (i.e. KI67, phospho-Histone H3, Caspase-3 clivée) réalisés sur les tumeurs n'ont pas été quantifiés et qu'il pourrait y avoir des différences non évidentes à la simple observation.

Discussion

Sur le plan moléculaire, j'ai comparé en priorité la localisation sub-cellulaire de la β -caténine car MUCDHL inhibe l'activité transcriptionnelle de celle-ci *in vitro* (Hinkel *et al.*, 2012) et l'expression de MUCDHL est particulièrement diminuée dans les sous-types moléculaires C4 et C5 qui présentent une activation de la voie WNT/ β -caténine. Comme la β -caténine avait une localisation majoritairement nucléaire dans les tumeurs des deux génotypes, il est possible que les tumeurs aient été analysées à un stade trop tardif pour pouvoir mettre en évidence une différence. Ceci est d'autant plus probable que j'ai constaté que même chez les souris *Apc* ^{Δ 14/+}; *Mucdh1*^{+/+} l'expression de MUCDHL est perdue dans la plupart des cellules tumorales. Comme dans les tumeurs colorectales humaines, j'ai observé une parfaite corrélation entre cette perte d'expression et la localisation nucléaire de la β -caténine (Losi *et al.*, 2011). Ces résultats peuvent être interprétés soit comme une diminution de la séquestration membranaire de la β -caténine en absence de MUCDHL, soit comme une répression de l'expression de MUCDHL par l'activité nucléaire de la β -caténine (Montorsi *et al.*, 2016 ; Bersuder *et al.*, en préparation^a). Il est également possible que ces deux processus s'auto-entretiennent comme MUCDHL et la β -caténine sont liés par une boucle d'auto-régulation négative. Outre la β -caténine, j'ai également examiné, sur la base des résultats que j'avais obtenus *in vitro* (cf § 3.1), la phosphorylation d'AKT et de l'EGFR par immunomarquage de coupes de tumeurs : cependant, étant donné le faible nombre de tumeurs dont je disposais, ces marquages montraient trop d'hétérogénéité inter et intra-tumorale pour pouvoir être concluants. Enfin, il faut garder à l'esprit que MUCDHL présente une double localisation sub-cellulaire et qu'il existe deux isoformes, ce qui pourrait se traduire par des fonctions différentes, notamment indépendantes de la β -caténine. Il est possible que la perte d'expression de MUCDHL au niveau des microvillosités de la bordure en brosse contribue au processus tumoral en perturbant par exemple la polarité apico-basale et donc la différenciation des entérocytes comme cela a été montré pour MYO1A, une protéine également localisée au niveau des microvillosités intestinales (Mazzolini *et al.*, 2012).

En conclusion, nos résultats *in vivo*, ainsi que des études antérieures, suggèrent que la perte de MUCDHL affecte des étapes précoces du développement tumoral. Or, au cours de cette étude, les animaux ont été sacrifiés à un âge assez avancé (6-8 mois) pour augmenter les

Discussion

chances de détection des tumeurs. A l'avenir, il serait intéressant de sacrifier les souris plus tôt (ex. 2-4 mois) pour analyser des stades plus précoces du processus tumoral. Des modèles d'inactivation conditionnelle de *Apc* et/ou de *Mucdhl* (e.g. *Cre^{ER}*) pourraient également être utiles pour détecter les conséquences cellulaires et moléculaires de la perte de MUCDHL. Par ailleurs, des analyses globales sans a priori des transcriptomes (i.e. RNA-SEQ) permettraient de dégager de nouvelles pistes au niveau moléculaire quant au mode d'action anti-tumoral de MUCDHL.

3. Mode d'action moléculaire de MUCDHL dans les cellules cancéreuses colique

Afin de décrypter comment MUCDHL joue son rôle de suppresseur de tumeurs au sein de l'épithélium intestinal, j'ai choisi d'étudier en parallèle son mode d'action moléculaire dans des modèles expérimentaux moins complexes, à savoir des lignées cellulaires.

3.1 Caractérisation du mécanisme d'inhibition de la β -caténine

Au début de mes travaux, il était admis, mais non démontré, que MUCDHL M inhibe l'activité transcriptionnelle de la β -caténine par séquestration membranaire. J'ai cherché à vérifier cette hypothèse en réalisant une étude exhaustive de type « structure-fonction » à l'aide d'une série de protéines tronquées de MUCDHL M. Si l'enchaînement des événements moléculaires impliqués reste à démontrer de façon formelle, mes résultats indiquent que le mode d'action de MUCDHL est complexe, impliquant son domaine intracellulaire et son domaine extracellulaire. De manière inattendue, j'ai constaté que la région cytoplasmique de MUCDHL M, nécessaire pour la liaison à la β -caténine, est suffisante mais non nécessaire pour inhiber son activité transcriptionnelle, la formation de colonies et la croissance sans ancrage. En effet, j'ai montré que le domaine extracellulaire de MUCDHL M était actif indépendamment de sa liaison à la β -caténine, notamment en interférant avec la signalisation EGFR/AKT.

Discussion

Ces nouvelles données sont intéressantes à plus d'un titre. Sur le plan phylogénétique, la conservation de la fonctionnalité malgré la divergence structurelle entre MUCDHL et l'E-cadhérine est intrigante. En effet, bien que ces protéines aient des domaines cytoplasmiques totalement différents, elles sont toutes deux capables de se lier et d'inhiber la β -caténine, mais via des zones différentes, à savoir la région distale pour l'E-cadhérine (Gottardi *et al.*, 2001) et la région juxtamembranaire pour MUCDHL M. De même, le domaine extracellulaire de MUCDHL M ne présente qu'une homologie limitée au niveau des motifs EC avec celui de l'E-cadhérine, mais possède des propriétés fonctionnelles similaires vis à vis de l'EGFR (liaison et inhibition voie de signalisation) (Lee *et al.*, 2010). Par ailleurs, comme l'EGFR favorise la croissance et la survie des colonocytes et est fréquemment surexprimé dans les CCR, il est utilisé comme cible thérapeutique pour traiter les tumeurs du côlon métastatiques non mutées pour *KRAS*, *NRAS* et *BRAF* (e.g. Cetuximab, Panitumumab). Or, il a été montré dans des modèles murins que l'EGFR est également impliqué dans les étapes précoces de la tumorigenèse intestinale : **i)** l'activité de l'EGFR et d'AKT est déjà augmentée dans les adénomes intestinaux ; **ii)** l'inhibition de l'EGFR diminue la prolifération des cellules tumorales et la formation de microadénomes (Moran *et al.*, 2004 ; Fichera *et al.*, 2007). A l'avenir, il sera donc important de mieux caractériser l'interaction fonctionnelle entre MUCDHL et l'EGFR, mais surtout de confirmer la pertinence de cette interaction pour le mode d'action anti-tumoral de MUCDHL. Ceci pourra être fait par marquages immunohistologiques de coupes de tumeurs ou des analyses transcriptomiques de tumeurs. Enfin, l'interaction de MUCDHL avec l'EGFR ouvre de nouvelles perspectives sur le plan conceptuel et translationnel (i.e. inhibition de récepteurs de croissance) qui vaudront la peine d'être abordées lors d'études ultérieures.

3.2 Identification de protéines interagissant avec MUCDHL

Un autre aspect important de mes travaux a consisté à rechercher et caractériser d'autres interactants de MUCDHL, afin d'identifier de nouveaux relais moléculaires de son activité anti-tumorale. Pour cela, un crible de double hybride chez la levure (Y2H) a été réalisé. Parmi les 127 clones positifs sélectionnés dans la librairie de côlon humain, seuls quelques-uns ont obtenu un bon indice de confiance quant à leur interaction avec MUCDHL. Il est possible que

Discussion

certaines interactions ne se soient pas produites chez la levure, notamment celles nécessitant une modification post-traductionnelle des protéines. L'utilisation d'une protéine de fusion LexA-MUCDHL comme appât a également pu générer une localisation et/ou une conformation inadéquate. En effet, cette protéine de fusion est nucléaire au lieu d'être membranaire et mes analyses de type « structure-fonction » (*cf* § 3.1) suggèrent que la conformation tridimensionnelle de la région intracellulaire de MUCDHL a une importance fonctionnelle. A l'avenir, il serait intéressant d'effectuer un crible Y2H adapté aux protéines membranaires (ex. MBmate Y2H, Hybrigenics) ou d'utiliser une autre technique d'identification des protéines interagissant avec MUCDHL comme par exemple la co-immunoprécipitation en tandem (DeCaprio & Kohl., 2019) ou un crible de type BioID (Roux *et al.*, 2018) couplé(e) à la spectrométrie de masse.

Toutefois, il est intéressant de noter que les protéines identifiées par le crible Y2H sont associées au cytosquelette d'Actine. En effet, les clones positifs comprenaient la forme intestinale de l'Actine (ACTG2), la protéine géante Titine (TTN), la petite GTPase RAB11A et l'adaptateur protéique ANK3. Ces protéines sont toutes exprimées dans l'épithélium intestinal et interagissent avec les microfilaments d'Actine par l'intermédiaire de la Myosine (TTN, RAB11A) ou de la Spectrine (ANK3) (Eilertsen *et al.*, 1992 ; Knowles *et al.*, 2015 ; Peters *et al.*, 1995). Compte tenu de la localisation MUCDHL au niveau de structures riches en Actine telles que les microvillosités et les jonctions cellulaires, ces interactions potentielles semblent cohérentes. En outre, il a déjà été démontré que RAB11A est nécessaire à la localisation apicale de MUCDHL dans les cellules intestinales (Knowles *et al.*, 2015).

La protéine obtenant l'indice de confiance le plus élevé était ANK3. Il s'agit d'une protéine d'échafaudage qui m'a parue intéressante car elle établit des sous-domaines membranaires spécialisés en assemblant et en stabilisant des complexes constitués de protéines transmembranaires, de molécules de signalisation et de composants du cytosquelette. De plus, il avait été montré qu'ANK3 inhibe l'activité transcriptionnelle de la β -caténine dans les progéniteurs neuraux du cortex en augmentant sa séquestration membranaire via l'E-cadhérine (Durak *et al.*, 2015). J'ai confirmé l'interaction entre MUCDHL et ANK3 dans les cellules intestinales et évalué par une stratégie de gain / perte de fonction l'impact d'ANK3 sur

Discussion

l'activité de MUCDHL. J'ai ainsi montré qu'ANK3 renforce spécifiquement l'effet inhibiteur de MUCDHL sur l'activité transcriptionnelle de la β -caténine en diminuant l'ubiquitination et la dégradation de MUCDHL par le protéasome. Ces résultats indiquent que j'ai identifié un nouveau régulateur post-traductionnel de MUCDHL et renforce l'idée selon laquelle ANK3 n'est pas simplement une protéine d'échafaudage, mais régule la localisation ou le niveau de certaines protéines transmembranaires, comme par exemple les Cadhérines (E-cadhérine, VE-cadhérine) ou encore le récepteur des androgènes (Cadwell *et al.*, 2016 ; Kizhatil *et al.*, 2007 ; Wang *et al.*, 2016).

En outre, j'ai découvert que MUCDHL interagit avec un variant spécifique d'ANK3 dans les cellules intestinales : bien que je ne puisse pas exclure l'existence de transcrits supplémentaires non encore référencés dans Genbank, il existe une forte probabilité pour que ce variant soit codé par le transcript NM_001149.3 et corresponde donc à l'isoforme 2 d'ANK3 (aussi appelée ici ANK3_149). Il est intéressant de noter que cette isoforme d'ANK3 est nettement plus courte que les autres et ne possède pas de répétitions « ankyrine » au niveau N-terminal. Or, une étude assez ancienne avait suggéré que seuls les transcrits courts d'ANK3, codant uniquement les domaines de liaison à la Spectrine et de régulation, sont détectés dans les cellules épithéliales des villosités intestinales (Peters *et al.*, 1995). En accord avec cette observation, j'ai montré que l'expression du transcript ANK3_149 est particulièrement importante dans l'intestin et est spécifiquement induite lors de la différenciation dans les cellules intestinales. Ainsi, le variant ANK3_149 pourrait contribuer en stabilisant MUCDHL à l'organisation de la surface apicale des cellules intestinales lors de leur différenciation. Cette hypothèse est en accord avec le rôle d'ANK3 dans la formation de sous-domaines membranaires spécialisés, notamment ceux liés à la polarité apico-basale (Cunha *et al.*, 2009). En effet, ANK3 est nécessaire à la localisation apicale ou baso-latérale de nombreux récepteurs, canaux ioniques ou molécules d'adhésion, que ce soit dans les cellules épithéliales (ex. canal ENaC apical dans les cellules rénales, E-cadherine baso-latérale dans les cellules bronchiques) ou même, dans les neurones, des mutations d'ANK3 étant associées à des troubles neuropsychiatriques (ex. molécules d'adhésion & canaux ioniques dans le segment proximal de l'axone) (Klemens *et al.*, 2017 ; Kizhatil *et al.*, 2007 ; Jones & Svitkina., 2016).

Discussion

Le mécanisme exact impliqué dans la stabilisation de MUCDHL doit être clarifié davantage et peut probablement impliquer d'autres mécanismes que la diminution de la dégradation des protéines par le protéasome. En effet, bien qu'il soit délicat de comparer des résultats obtenus dans des lignées différentes exprimant MUCDHL de façon exogène ou endogène, l'impact modéré d'ANK3 sur la stabilité protéique (HEK293 : expériences de cycloheximide) de MUCDHL ne semble pas être à même d'expliquer la disparition dramatique de MUCDHL observée en son absence (Caco-2/TC7 : immunofluorescence). Par la suite, il sera intéressant d'explorer d'autres pistes, telles que le recyclage via des vésicules d'endocytose ou la dégradation endo-lysosomale en utilisant des inhibiteurs et/ou des marqueurs spécifiques de ces processus. En effet, il a été montré qu'ANK3 favorise la localisation membranaire de différentes protéines en s'opposant à leur endocytose et dégradation (ex. dimères de VE-cadhérine ; [Cadwell et al., 2016](#)) ou en favorisant leur recyclage vésiculaire (ex. Canal Sodium Epithélial ENaC ; [Klemens et al., 2017](#)). Pour rappel, RAB11, également identifiée comme partenaire de MUCDHL et nécessaire à sa localisation apicale, est une protéine cruciale des endosomes de recyclage apical ([Knowles et al., 2015](#)). En outre, il semblerait que les variants courts d'ANK3, dépourvus de répétitions « ankyrine » au niveau N-terminal, ne seraient pas détectés à la membrane plasmique, mais plutôt dans des vésicules intracellulaires d'endocytose ([Peters et al., 1995](#)). Toutefois, en absence d'anticorps spécifique du variant ANK3_149, il est délicat de vérifier sa localisation au sein de l'épithélium intestinal.

Enfin, j'ai montré pour la première fois que l'expression de cette isoforme d'ANK3 est diminuée dans les pathologies intestinales que sont les cancers du côlon et les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, ce qui, au vu du rôle d'ANK3 dans l'organisation et le maintien de la polarité cellulaire, pourrait contribuer à la tumorigenèse. Quelques publications avaient déjà fait allusion à une dérégulation d'ANK3 dans le cancer, montrant que sa perte faisait partie d'une signature de 11 gènes prédisant l'échec thérapeutique dans divers types de cancer ([Glinsky et al., 2005](#)) ou des mutations dans les CCR. Ainsi, au-delà de la régulation de MUCDHL, cette étude souligne l'intérêt d'étudier ANK3 et ses isoformes dans le contexte du cancer.

Discussion

II- Conclusion générale

Près de 20 ans après sa découverte, le rôle original et important de la Cadherine atypique MUCDHL dans l'homéostasie intestinale commence à peine à être dévoilé. Mes travaux de thèse ont contribué à démontrer le rôle de suppresseur de tumeur de MUCDHL dans l'épithélium intestinal et suggèrent que sa perte a des conséquences sur les étapes précoces de la tumorigenèse (i.e. formation, croissance). Au niveau moléculaire, mes résultats ont permis d'apporter de nouvelles informations sur la régulation (ANK3_149) et le mode d'action de MUCDHL (inhibition β -caténine, EGFR/AKT), mais, en l'état, mettent surtout en exergue une convergence fonctionnelle avec les Cadhérines classiques en dépit de la faible homologie de séquence. Des études futures permettront d'apporter de nouveaux éléments qui affineront notre connaissance du mode d'action moléculaire et cellulaire spécifique à MUCDHL. Au-delà de MUCDHL et des Cadhérines atypiques, l'enjeu de ces travaux est de comprendre comment l'altération des voies de signalisation qui gouvernent la morphologie et le fonctionnement des cellules épithéliales se répercute sur la prolifération et la survie cellulaire, favorisant ainsi la progression tumorale. Ces connaissances devraient déboucher à terme sur des applications cliniques, que ce soit par l'identification de marqueurs diagnostiques et pronostiques permettant une meilleure caractérisation individuelle des tumeurs des patients dans le contexte du développement des thérapies personnalisées, ou par l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques innovantes visant à limiter la progression tumorale.

BIBLIOGRAPHIE

-A-

- Abraham, C., and Cho, J.H. (2009). Inflammatory Bowel Disease. *New England J. Med.* 361, 2066-2078.
- Al-Tassan, N., Chmiel, N.H., Maynard, J., Fleming, N., Livingston, A.L., Williams, G.T., Hodges, A.K., Davies, D.R., David, S.S., Sampson, J.R., and Cheadle, J.P. (2002). Inherited variants of MYH associated with somatic G:C-->T:A mutations in colorectal tumors. *Nat. Genet.* 30, 227-232.
- Althumairi, A.A., and Gearhart, S.L. (2015). Local excision for early rectal cancer: transanal endoscopic microsurgery and beyond. *J. Gastrointest. Oncol.* 6, 296-306.
- Andersson, R.E., Olaison, G., Tysk, C., and Ekblom, A. (2001). Appendectomy and Protection against Ulcerative Colitis. *New England J. Med.* 344, 808-814.
- Andreu, P., Colnot, S., Godard, C., Gad, S., Chafey, P., Niwa-Kawakita, M., Laurent-Puig, P., Kahn, A., Robine, S., Perret, C., and Romagnolo, B. (2005). Crypt-restricted proliferation and commitment to the Paneth cell lineage following Apc loss in the mouse intestine. *Development* 132, 1443-1451.
- Angers, S., and Moon, R.T. (2009). Proximal events in Wnt signal transduction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 468-477.
- Angst, B., Marozzi, C., and Magee, A. (2001) The cadherin superfamily: diversity in form and function. *J Cell Sci.* 114, 629-41
- Araya-Secchi, R., Neel, B.L., and Sotomayor M. (2016). An elastic element in the protocadherin-15 tip link of the inner ear. *Nat Commun* 7:13458.
- Arnold, M., Sierra, M.S., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., and Bray, F. (2016). Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut* 0, 1-9.
- Avissar, N.E., Wang, H.T., Miller, J.H., Iannoli, P., and Sax, H.C. (2000). Epidermal growth factor receptor is increased in rabbit intestinal brush border membrane after small bowel resection. *Dig Dis Sci.* 45, 1145-1152.
- Ayabe, T., Satchell, D.P., Wilson, C.L., Parks, W.C., Selsted, M.E., and Ouellette, A.J. (2000). Secretion of microbicidal alpha-defensins by intestinal Paneth cells in response to bacteria. *Nat. Immunol.* 1, 113-118.

-B-

- Balaguer, F., Castellví-Bel, S., Castells, A., Andreu, M., Muñoz, J., Gisbert, J.P., Llor, X., Jover, R., de Cid, R., Gonzalo, V., Bessa, X., Xicola, R.M., Pons, E., Alenda, C., Payá, A., and Piqué, J.M. (2007). Identification of MYH mutation carriers in colorectal cancer: a multicenter, case-control, population-based study. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 5, 379-387.
- Balbinot, C., Armant, O., Elarouci, N., Marisa, L., Martin, E., De Clara, E., Onea, A., Deschamps, J., Beck, F., Freund, J.N., Duluc, I. (2018). The Cdx2 homeobox gene suppresses intestinal tumorigenesis through non-cell-autonomous mechanisms. *J Exp Med.* 215, 911-926.
- Baranger, M., Moufok-Sadoun, A., Le May, C., Crawley, S.W., Bersuder, E., Beck, M., Martin, E., Demignot, S., Mellitzer, G., Tyska, M.J., Duluc, I., Freund, J.N., and Gross, I. Brush border Cadherin MUCDHL controls the digestive metabolism. (*in preparation*).
- Barker, N., van Es, J.H., Kuipers, J., Kujala, P., van den Born, M., Cozijnsen, M., Haegebarth, A., Korving, J., Begthel, H., Peters, P.J., et al. (2007). Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. *Nature* 449, 1003-1007.

- Barry, E.R., Morikawa, T., Butler, B.L., Shrestha, K., De la Rosa, R., Yan, K.S., Fuchs, C.S., Magness, S.T., Smits, R., Ogino, S., et al. (2013). Restriction of intestinal stem cell expansion and the regenerative response by YAP. *Nature* 493, 106-110.
- Batlle, E., Henderson, J.T., Beghtel, H., Van den Born, M.M.W., Sancho, E., Huls, G., Meeldijk, J., Robertson, J., Van de Wetering, M., Pawson, T., and Clevers, H. (2002). Beta-catenin and TCF mediate cell positioning in the intestinal epithelium by controlling the expression of EphB/ephrinB. *Cell* 111, 251-263.
- Baumgart, D.C., and Carding, S.R. (2007). Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. (Review). *Lancet* 369, 1627-1640.
- Baumgartner, W. (2013). Possible roles of LI-Cadherin in the formation and maintenance of the intestinal epithelial barrier. *Tissue Barriers*. 1(1): e23815.
- Beck, S., Jung, B., Del Rosario, E., Gomez, J., and Carethers, J. (2007). BMP-induced growth suppression in colon cancer cells is mediated by p21WAF1 stabilization and modulated by RAS/ERK. *Cell. Signal.* 19, 1465-1472.
- Bedeir, A., and Krasinskas, A.M. (2011). Molecular diagnostics of colorectal cancer. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 135, 578-587.
- Bersuder, E., Martin, E., Freund, J.N., Reimund J.M., and Gross, I. Multiple transcriptional factors mediate the up-regulation of the Cadherin-related gene MUCDHL by the anti-inflammatory drug mesalazine. (in preparation^a).
- Bersuder, E., Le Com, L., Moufok-Sadoun A., Martin, E., Le May, C., Crawley, S.W., Freund, J.N., Reimund, J.M., and Gross, I. The atypical Cadherin MUCDHL is involved in the pathogeny and evolution of inflammatory bowel disease. (in preparation^b).
- Berx, G., and van Roy, F. (2009). Involvement of members of the cadherin superfamily in cancer. (Review). *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 1(6):a003129.
- Binnerts, M.E., Kim, K.-A., Bright, J.M., Patel, S.M., Tran, K., Zhou, M., Leung, J.M., Liu, Y., Lomas, W.E., Dixon, M., Hazell, S.A., Wagle, M., Nie, W.S., Tomasevic, N., Williams, J., Zhan, X., Levy, M.D., Funk, W.D., and Abo, A. (2007). R-Spondin1 regulates Wnt signaling by inhibiting internalization of LRP6. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 14700-14705.
- Bläsius, F.M., Meller, S., Stephan, C., Jung, K., Ellinger, J., Glocker, M.O., Thiesen, H.J., Tolkach, Y., and Kristiansen, G. (2017). Loss of cadherin related family member 5 (CDHR5) expression in clear cell renal cell carcinoma is a prognostic marker of disease progression. *Oncotarget* 8, 75076-75086.
- Boggon, T.J., Murray, J., Chappuis-Flament, S., Wong, E., Gumbiner, B.M., and Shapiro, L. (2002). C-cadherin ectodomain structure and implications for cell adhesion mechanisms. *Science* 296, 1308-1313.
- Boland, R.C., and Goel, A. (2010). Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology* 138, 2073-2087.
- 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.
- Bovolenta, P., Esteve, P., Ruiz, J.M., Cisneros, E., and Lopez-Rios, J. (2008). Beyond Wnt inhibition: new functions of secreted Frizzled-related proteins in development and disease. *J Cell Sci.* 121, 737-746.
- Brabletz, T., Jung, A., Spaderna, S., Hlubek, F., and Kirchner, T. (2005). Migrating cancer stem cells an integrated concept of malignant tumour progression. *Nature* 5, 744-749.

- Bragdon, B., Moseychuk, O., Saldanha, S., King, D., Julian, J., and Nohe, A. (2011). Bone morphogenetic proteins: a critical review. *Cell. Signal.* *23*, 609-620.
- Brosens, L.A.A., van Hattem, A., Hylind, L.M., Iacobuzio-Donahue, C., Romans, K.E., Axilbund, J., Cruz-Correa, M., Tersmette, A.C., Offerhaus, G.J.A., and Giardiello, F.M. (2007). Risk of colorectal cancer in juvenile polyposis. *Gut* *56*, 965-967.
- Brown, E.M., Sadarangani, M., and Finlay, B.B. (2012). The role of the immune system in governing host-microbe interactions in the intestine. (Review). *Nat Immunol* *14*, 660-667.
- Bujko, M., Kober, P., Statkiewicz, M., Mikula, M., Ligaj, M., Zwierzchow, L., Ostrowski, J., and Siedlecki, J.A. (2015). Epigenetic-mediated downregulation of mu-Protocadherin in colorectal tumours. *Gastroenterol Res Pract*: 317093.
- Butterworth, A.S., Higgins, J.P., and Pharoah, P. (2006). Relative and absolute risk of colorectal cancer for individuals with a family history: a meta-analysis. *Eur. J. Cancer (Oxford, Engl. 1990)* *42*, 216-227.

-C-

- Cadwell, C.M., Jenkins, P.M., Bennett, V., Kowalczyk, A.P. (2016). Ankyrin-G inhibits endocytosis of Cadehrin dimers. *J Biol Chem* *291*, 691-704.
- Calkins, B.M. (1989). A meta-analysis of the role of smoking in inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* *34*, 1841-1854.
- Carbonnel, F., Jantchou, P., Monnet, E., and Cosnes, J. (2009). Environmental risk factors in Crohn's disease and ulcerative colitis: an update. *Gastroenterol Clin Biol*, *33* Suppl3: S145-157.
- Carmon, K.S., Gong, X., Lin, Q., Thomas, A., and Liu, Q. (2011). R-spondins function as ligands of the orphan receptors LGR4 and LGR5 to regulate Wnt/beta-catenin signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *108*, 11452-11457.
- Cathomas, G. (2014). PIK3CA in Colorectal Cancer. *Front. Oncol.* *4*:35.
- Chen, Y., and Jiang, J. (2013). Decoding the phosphorylation code in Hedgehog signal transduction. *Cell Res.* *23*, 186-200.
- Cheng, H., and Leblond, C.P. (1974). Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. *Am. J. Anat.* *141*, 537-561.
- Ciombor, K.K., Wu, C., and Goldberg, R.M. (2015). Recent therapeutic advances in the treatment of colorectal cancer. *Annu. Rev. Med.* *66*, 83-95.
- Clevers, H. (2006). Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell* *127*, 469-480.
- Clevers, H., and Bevins, C.L. (2013). Paneth cells: maestros of the small intestinal crypts. *Annu. Rev. Physiol.* *75*, 289-311.
- Clevers, H., Loh, K.M., and Nusse, R. (2014). An integral program for tissue renewal and regeneration: Wnt signaling and stem cell control. (Review). *Science* *346*, 1248012:1-1248012:7.
- Cosnes, J., Beaugerie, L., Carbonnel, F., and Gendre, J.P. (2001). Smoking cessation and the course of Crohn's disease: an intervention study. *Gastroenterology*, *120*(5), 1093-1099.

- Cosnes, J., Gower-Rousseau, C., Seksik, P., and Cortot, A. (2011). Epidemiology and natural history of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* *140*, 1785-1794.
- Crawley, S.W., Shifrin, D.A., Grega-Larson, N.E., McConnell, R.E., Benesh, A.E. et al (2014). Intestinal brush border assembly driven by protocadherin-based intermicrovillar adhesion. *Cell* *157*, 1-14.
- Cunha, S.R., and Mohler, P.J. (2009). Ankyrin protein networks in membrane formation and stabilization. *J. Cell Mol. Med.* *13*, 4364-4376.

-D-

- De, A. (2011). Wnt/Ca²⁺ signaling pathway: a brief overview. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*. *43*, 745-756.
- DeCaprio, J., and Kohl, T.O. (2019). Tandem immunoaffinity purification using anti-FLAG and anti-HA antibodies. *Cold Spring Harb Protoc* 2019(2):pdb.prot098657.
- Demitrack, E.S., and Samuelson, L.C. (2016). Notch regulation of gastrointestinal stem cells. *J. Physiol. (Lond.)* *594*, 4791-4803.
- van Den Brink, G.R. (2007). Hedgehog signaling in development and homeostasis of the gastrointestinal tract. *Physiol. Rev.* *87*, 1343-1375.
- Derwinger, K., Kodeda, K., Bexe-Lindskog, E., and Taflin, H. (2010). Tumour differentiation grade is associated with TNM staging and the risk of node metastasis in colorectal cancer. *Acta Oncol.* *49*, 57-62.
- Ding, M., and Wang, X. (2017). Antagonism between Hedgehog and Wnt signaling pathways regulates tumorigenicity. (Review). *Oncology Letters* *14*, 6327-6333.
- Durak, O., de Anda, F.C., Singh, K.K., Leussis, M.P., Petryshen, T.L., Sklar, P., and Tsai, L.H. (2015). Ankyrin-G regulates neurogenesis and Wnt signaling by altering the subcellular localization of β -catenin. *Mol. Psychiatry* *20*, 1-10.
- Dusek, R., and Attardi, L. (2011). Desmosomes: new perpetrators in tumour suppression. *Nat Rev Cancer.* *11*, 317-323.

-E-

- Eilertsen, K.J., and Keller, T.C. (1992). Identification and characterization of two huge protein components of the brush border cytoskeleton: evidence for a cellular isoform of titin. *J Cell Biol* *119*, 549-557.
- van Es, J.H., Jay, P., Gregorieff, A., van Gijn, M.E., Jonkheer, S., Hatzis, P., Thiele, A., van den Born, M., Begthel, H., Brabletz, T., Taketo, M.M., and Clevers, H. (2005). Wnt signalling induces maturation of Paneth cells in intestinal crypts. *Nat. Cell Biol.* *7*, 381-386.
- Esteller, M., Sparks, A., Toyota, M., M, S.-C., Capella, G., Peinado, M.A., Gonzalez, S., Tarafa, G., Sidransky, D., Meltzer, S.J., Baylin, S.B., and Herman, J.G. (2000). Analysis of adenomatous polyposis coli promoter hypermethylation in human cancer. *Cancer Res.* *60*, 4366-4371.

-F-

- Fang, D., Hawke, D., Zheng, Y., Xia, Y., Meisenhelder, J., Nika, H., Mills, G.B., Kobayashi, R., Hunter, T., and Lu, Z. (2007). Phosphorylation of beta-catenin by AKT promotes beta-catenin transcriptional activity. *J Biol Chem.* *282*, 11221-11229.

- Fearon, E.R., and Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61, 759-767.
- Fearon, E.R. (2011). Molecular genetics of colorectal cancer. *Annu. Rev. Pathol.* 6, 479-507.
- Fichera, A., Little, N., Jagadeeswaran, S., Doudherty, U., Sehdev, A., Mustafi, R., Cerda, S., Yuan, W., Khare, S., Tretiakova, M., Gong, C., Tallero, M., Cohen, G., Joseph, L., Hart, J., Turner, J.R., and Bissonnette, M. (2007). Epidermal growth factor receptor signaling is required for microadenoma formation in the mouse azoxymethane model of colonic carcinogenesis. *Cancer Res* 67, 827-835.

-G-

- Gallin, W.J., Edelman, G.M., and Cunningham, B.A. (1983). Characterization of L-CAM, a major cell adhesion molecule from embryonic liver cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80, 1038-1042.
- Gama, A., and Schmitt, F. (2012). Cadherin cell adhesion system in canine mammary cancer: a review. *Vet Med Int.* 2012:357187.
- Garinis, G.A., Manounos, P.G., Spanakis, N.E., Papadopoulos, K., Karavitis, G., Parassi, I., Christeli, E., Patrinos, G.P., Manolis, E.N., and Peros, G. (2002). Hypermethylation-associated transcriptional silencing of E-cadherin in primary sporadic colorectal carcinomas. *J Pathol.* 198, 442-449.
- Geiersbach, K.B., and Samowitz, W.S. (2011). Microsatellite instability and colorectal cancer. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 135, 1269-1277.
- Gerbe, F., Van Es, J.H., Makrini, L., Brulin, B., Mellitzer, G., Robine, S., Romagnolo, B., Shroyer, N.F., Bourgaux, J.F., Pignodel, C., Clevers, H., and Jay, P. (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.
- Gerbe, F., Legraverend, C., and Jay, P. (2012). The intestinal epithelium tuft cells : specification and function. *Cell. Mol. Life Sci. C.* 69, 2907-2917.
- Gerbe, F., Sidot, E., Smyth, D.J., Ohmoto, M., Matsumoto, I., Dardalhon, V., Cesses, P., Garnier, L., Pouzolles, M., Brulin, B., Bruschi, M., Harcus, Y., Zimmermann, V.S., Taylor, N., Maizels, R.M., and Jay, P. (2016). Intestinal epithelial tuft cells initiate type 2 mucosal immunity to helminth parasites. *Nature* 529, 226-230.
- Glinsky G.V., Berezovska O., and Glinskii A.B. (2005). Microarray analysis identifies a death-from cancer signature predicting therapy failure in patients with multiple types of cancer. *J. Cell. Invest.* 15, 1503-1521.
- Goldberg, M., Peshkovsky, C., Shifteh, A., and Al-Awqati, Q. (2000). Mu-Protocadherin, a novel developmentally regulated protocadherin with mucin-like domains. *J. Bio. Chem.* 275, 24622-24629.
- Goldberg, M., Wei, M., Tycko, B., Falikovich, I., and Warburton, D. (2002). Identification and expression analysis of the human mu-protocadherin gene in fetal and adult kidneys. *Am J Physiol Renal Physiol* 283, 454-463.
- Gong, X., Carmon, K.S., Lin, Q., Thomas, A., Yi, J., and Liu, Q. (2012). LGR6 is a high affinity receptor of R-Spondins and potentially functions as a tumor suppressor. *PLoS ONE* 7.
- Gottardi, C.J., Wong, E. and Gumbiner B.M. (2001). E-cadherin suppresses cellular transformation by inhibiting beta-catenin signaling in an adhesion-independent manner. *J. Cell Biol* 153, 1049-1060.
- Gregorieff, A., Pinto, D., Begthel, H., Destree, O., Kielman, M., and Clevers, H. (2005). Expression pattern of Wnt signaling components in the adult intestine. *Gastroenterology* 129, 626-638.

- Guinney, J., Dienstmann, R., Wang, X., de Reyniès, A., Schlicker, A., Soneson, C., Marisa, L., Roepman, P., Nyamundanda, G., Angelino, P., Bot, B.M., Morris, J.S., et al. (2015). The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med* 21, 1350-1356.
- Gunawardene, A.R., Corfe, B.M., and Staton, C.A. (2011). Classification and functions of enteroendocrine cells of the lower gastrointestinal tract. *Int. J. Exp. Pathol.* 92, 219-231.
- Guo, L., and Teng, L. (2015). YAP/TAZ for cancer therapy: opportunities and challenges. (Review). *Int. J. Oncol.* 46, 1444-1452.

-H-

- Haggard, F.A., and Boushey, R.P. (2009). Colorectal cancer epidemiology: incidence, mortality, survival, and risk factors. *Clin. Colon Rectal Surg.* 22, 191-197.
- Halbleib J. and Nelson W. (2006) Cadherins in development: cell adhesion, sorting, and tissue morphogenesis. *Genes Dev.* 20, 3199-3214.
- Half, E., Bercovich, D., and Rozen, P. (2009). Familial adenomatous polyposis. *Orphanet J. Rare Dis.* 4.
- Hall, P.A., Coates, P.J., Ansari, B., and Hopwood, D. (1994). Regulation of cell number in the mammalian gastrointestinal tract : the importance of apoptosis. *J. Cell Sci.* 3577, 3569-3577.
- Hatta, K., Nose, A., Nagafuchi, A., and Takeichi, M. (1988). Cloning and expression of cDNA encoding a neural calcium-dependant cell adhesion molecule: its identity in the cadherin gene family. *J Cell Biol.* 106, 873-881.
- He, T.C., Sparks, A.B., Rago, C., Hermeking, H., Zawel, L., da Costa, L.T., Morin, P.J., Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. (1998). Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* 281, 1509-1512.
- Heijink, I.H., Kies, P.M., Kauffman, H.F., Postma, D.S., van Oosterhout, A.J., and Vellenga, E. (2007). Down-regulation of E-cadherin in human bronchial epithelial cells leads to epidermal growth factor receptor-dependant Th2 cell-promoting activity. *J Immunol.* 178, 7678-7685.
- 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 β -catenin activity in colon cancer cells. *Gastroenterology*, 142, 875-885.
- 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.
- Hoschuetzky, H., Aberle, H., and Kemler, R. (1994). Beta-catenin mediates the interaction of the cadherin-catenin complex with epidermal growth factor receptor. *J Cell Biol.* 127, 1375-1380.
- Howe, J.R., Roth, S., Ringold, J.C., Summers, R.W., Järvinen, H.J., Sistonen, P., Tomlinson, I.P., Houlston, R.S., Bevan, S., Mitros, F.A., Stone, E.M., and Aaltonen, L.A. (1998). Mutations in the SMAD4/DPC4 gene in juvenile polyposis. *Science* 280, 1086-1088.
- Howe, J.R., Bair, J.L., Sayed, M.G., Anderson, M.E., Mitros, F. a, Petersen, G.M., Velculescu, V.E., Traverso, G., and Vogelstein, B. (2001). Germline mutations of the gene encoding bone morphogenetic protein receptor 1A in juvenile polyposis. *Nat. Genet.* 28, 184-187.
- Howitt, M.R., Lavoie, S., Michaud, M., Blum, A.M., Tran, S. V, Weinstock, J., Gallini, C., Redding, K., Margolskee, R., Osborne, L.C., Artis, D., and Garrett, W.S. (2016). Tuft cells, taste-chemosensory cells, orchestrate parasite type 2 immunity in the gut. *Science* 351, 1329-1333.

- Huels, D. J., Ridgway, R. A., Radulescu, S., Leushacke, M., Campbell, A.D., Biswas, S., Leedham, S., Serra, S., Chetty, R., Moreaux, G., Parry, L., Matthews, J., Song, F., Hedley, A., Kalna, G., Ceteci, F., Reed, K.R., Meniel, V.S., Maguire, A., Doyle, B., Soderberg, O., Barker, N., Watson, A., Larue, L., Clarke A.R., and Sansom O.J. (2015). E-cadherin can limit the transforming properties of activating beta-catenin mutations. *EMBO J.* *34*, 2321-2333.
- Hugot J.P., Chamaillard, M., Zouali, H., Lesage, S., Cézard, J.P., Belaiche, J., Almer, S., Tysk, C., O'Morain, C.A., Gassull, M., Binder, V., Finkel, Y., Cortot, A., Modigliani, R., Laurent-Puig, P., Gower-Rousseau, C., Macry, J., Colombel, J.F., Sahbatou, M., and Thomas, G. (2001). Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* *411*, 599-603.
- Hulpiau, P., and van Roy, F. (2011). New insights into the evolution of metazoan cadherins. *Mol Bio Evol.* *28*, 647-657.
- Hulpiau, P., Gul, I.S., and van Roy, F. (2013). New insights into the evolution of metazoan cadherins and catenins. *Prog Mol Biol Transl Sci.* *116*, 71-94.
- Hussain, M.M. (2014). Intestinal lipid absorption and lipoprotein formation. *Curr. Opin. Lipidol.* *25*, 200-206.
- Huttenhower, C., Kostic, A.D., and Xavier, R.J. (2014). Inflammatory bowel disease as a model for translating the microbiome. *Immunity* *40*, 843-854.
- Huxley, R.R., Ansary-Moghaddam, A., Clifton, P., Czernichow, S., Parr, C.L., and Woodward, M. (2009). The impact of dietary and lifestyle risk factors on risk of colorectal cancer: a quantitative overview of the epidemiological evidence. *Int. J. Cancer* *125*, 171-180.
- Hyafil, F., Babinet, C., and Jacob, F. (1981). Cell-cell interactions in early embryogenesis: a molecular approach to the role of calcium. *Cell* *26*, 447-454.

-I-

- Ireland, H., Kemp, R., Houghton, C., Howard, L., Clarke, A.R., Sansom, O.J., and Winton, D.J. (2004). Inducible Cre-mediated control of gene expression in the murine gastrointestinal tract: effect of loss of beta-catenin. *Gastroenterology* *126*, 1236-1246.
- Itasaki, N., Jones, C.M., Mercurio, S., Rowe, A., Domingos, P.M., Smith, J.C., and Krumlauf, R. (2003). Wise, a context-dependent activator and inhibitor of Wnt signalling. *Development* *130*, 4295-4305.

-J-

- Jass, J.R., Barker, M., Fraser, L., Walsh, M.D., Whitehall, V.L.J., Gabrielli, B., Young, J., and Leggett, B.A. (2003). APC mutation and tumour budding in colorectal cancer. *Journal of Clinical Pathology* *56*, 69-73.
- Javelaud, D., and Mauviel, A. (2005). Crosstalk mechanisms between the mitogen-activated protein kinase pathways and Smad signaling downstream of TGF-beta: implications for carcinogenesis. *Oncogene* *24*, 5742-5750.
- Jenne, D., Reimann, H., Nezu, J., Friedel, W., Loff, S., Jeschke, R., Müller, O., Back, W., and Zimmer, M. (1998). Peutz-Jeghers syndrome is caused by mutations in a novel serine threonine kinase. *Nat. Genet.* *18*, 38-43.
- Jensen, J., Pedersen, E.E., Galante, P., Hald, J., Heller, R.S., Ishibashi, M., Kageyama, R., Guillemot, F., Serup, P., and Madsen, O.D. (2000). Control of endodermal endocrine development by Hes-1. *Nat. Genet.* *24*, 36-44.
- Jones, S.L., and Svitkina, T.M. (2016). Axon Initial Segment Cytoskeleton : architecture, development, and role in Neuron polarity. *Neural Plast* 2016:6808293.

• Jung, B., Beck, S., Cabral, J., Chau, E., Cabrera, B., Fiorino, A., Smith, E., Bocanegra, M., and Carethers, J. (2007). Activin type 2 receptor restoration in MSI-H colon cancer suppresses growth and enhances migration with activin. *Gastroenterology* 132, 633-644.

-K-

• Kane, M.F., Loda, M., Gaida, G.M., Lipman, J., Mishra, R., Goldman, H., Jessup, J., and Kolodner, R. (1997). Methylation of the hMLH1 promoter correlates with lack of expression of hMLH1 in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines. *Cancer Res.* 57, 808-811.

• Khan, K., Hardy, R., Haq, A., Ogunbiyi, O., Morton, D., and Chidgey, M. (2006). Desmocollin switching in colorectal cancer. *Br J Cancer.* 95, 1367-1370.

• Kim, Y.S., and Ho, S.B. (2010). Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: Recent insights and progress. *Curr. Gastroenterol. Rep.* 12, 319-330.

• Kim, J.J., and Khan, W.I. (2013). Goblet cells and mucins: role in innate defense in enteric infections. *Pathogens* 2, 55-70.

• Kizhatil, K., Davis, J.Q., Davis, L., Hoffman, J., Hogan, B.L.M., and Bennett, V. (2007). Ankyrin-G is a molecular partner of E-cadherin in epithelial cells and early embryos. *J. Bio. Chem.* 282, 26552-26561.

• Klemens, C.A., Edinger, R.S., Kightlinger, L., Liu, X., and Butterworth, M.B. (2017). Ankyrin G expression regulates apical delivery of the epithelial sodium channel (ENaC). *J Biol Chem* 292, 375-385.

• Knowles, B.C., Weis, V.G., Yu, S., Roland, J.T., Williams, J.A., Alvarado, G.S., Lapierre, L.A., Shub, M.D., Gao, N., and Goldenring J.R. (2015). Rab11a regulates syntaxin 3 localization and microvillus assembly in enterocytes. *J Cell Sci* 128, 1617-1626.

• Kohn, A., and Moon, R. (2005). Wnt and calcium signaling: beta-catenin-independent pathways. *Cell Calcium* 38, 439-446.

• Kolegraff, K., Nava, P., Helms, M.N., Parkos, C.A., and Nusrat, A. (2011). Loss of desmocollin-2 confers a tumorigenic phenotype to colonic epithelial cells through activation of AKT/ β -catenin signaling. *Mol Biol Cell* 22, 1121-1134.

• Krupnik, V.E., Sharp, J.D., Jiang, C., Robison, K., Chickering, T.W., Amaravadi, L., Brown, D.E., Guyot, D., Mays, G., Leiby, K., Chang, B., Duong, T., Goodearl, A.D., Gearing, D.P., Sokol, S.Y., and McCarthy, S.A. (1999). Functional and structural diversity of the human Dickkopf gene family. *Gene* 238, 301-313.

• Kucharzik, T., Lügering, N., Rautenberg, K., and Lügering, A. (2000). Role of M cells in intestinal barrier function. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 915, 171-183.

• Kuhnert, F., Davis, C.R., Wang, H.T., Chu, P., Lee, M., Yuan, J., Nusse, R., and Kuo, C.J. (2004). Essential requirement for Wnt signaling in proliferation of adult small intestine and colon revealed by adenoviral expression of Dickkopf-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 266-271.

-L-

• Lao, V., and Grady, W. (2011). Epigenetics and colorectal cancer. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 8, 686-700.

• de Lau, W., Barker, N., Low, T.Y., Koo, B.-K., Li, V.S.W., Teunissen, H., Kujala, P., Haegerbarth, A., Peters, P.J., van de Wetering, M., Stange, D.E., van Es, J.E., Guardavaccaro, D., Schasfoort, R.B., Mohri, Y., Nishimori, K.,

Mohammed, S., Heck, A.J., and Clevers, H. (2011). Lgr5 homologues associate with Wnt receptors and mediate R-spondin signalling. *Nature* 476, 293-297.

- de Lau, W., Peng, W.C., Gros, P., and Clevers, H. (2014). The R-spondin/Lgr5/Rnf43 module: regulator of Wnt signal strength. (Review). *Gene Dev.* 28, 305-316.
- Lecomte, T., André, T., Bibeau, F., Blanc, B., Cohen, R., Lagasse, J.P., Laurent-Puig, P., Martin-Babau, J., Panis, Y., Portales, F., Taïeb, J., et Vaillant, E. (2019). Cancer du côlon non métastatique. *Thésaurus National de Cancérologie Digestive*. [<https://www.snfge.org/tncd> et <http://www.tncd.org>]
- Lee, C.H., Hung, H.W., Hung, P.H., and Shieh, Y.S. (2010). Epidermal growth factor receptor regulates beta-catenin location, stability, and transcriptional activity in oral cancer. *Mol Cancer* 9:64.
- Lengauer, C., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1998). Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 396, 643-649.
- van Lier, M.G.F., Wagner, A., Mathus-Vliegen, E.M.H., Kuipers, E.J., Steyerberg, E.W., and van Leerdam, M.E. (2010). High cancer risk in Peutz-Jeghers syndrome: a systematic review and surveillance recommendations. *Am. J. Gastroenterol.* 105, 1258-1264.
- Losi, L., Parenti, S., Ferrarini, F., Rivasi, F., Gavioli, M., Natalini, G., Ferrari, S., and Grande, A. (2011). Down-regulation of μ -protocadherin expression is a common event in colorectal carcinogenesis. *Hum. Pathol.* 42, 960-971.
- Lynch, H.T., and de la Chapelle, A. (2003). Hereditary colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* 348, 919-932.

-M-

- MacDonald, B.T., Tamai, K., and He, X. (2009). Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms and diseases. *Dev Cell.* 17, 9-26.
- Madison, B.B., Braunstein, K., Kuizon, E., Portman, K., Qiao, X.T., and Gumucio, D.L. (2005). Epithelial hedgehog signals pattern the intestinal crypt-villus axis. *Development* 132, 279-289.
- Marchesi, J., and Shanahan, F. (2007). The normal intestinal microbiota. *Curr Opin Infect Dis.* 20, 508-513.
- Marcozzi, C., Burdett, I.D., Buxton, R.S., and Magee, A.I. (1998). Coexpression of both types of desmosomal cadherin and plakoglobin confers strong intercellular adhesion. *J Cell Sci.* 111, 495-509.
- Marisa, L., de Reyniès, A., Duval, A., Selves, J., Gaub, M.P., Vescovo, L., Etienne-Grimaldi, M.C., Schiappa, R., Guenot, D., Ayadi, M., Kirzin, S., Chazal, 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.
- Markowitz, S.D., and Bertagnolli, M.M. (2009). Molecular origins of cancer: Molecular basis of colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* 361, 2449-2460.
- Marshman, E., Booth, C., and Potten, C.S. (2002). The intestinal epithelial stem cell. *Bioessays* 24, 91-98.
- Martin-Belmonte, F., and Perez-Moreno, M. (2012). Epithelial cell polarity, stem cells and cancer. *Nat Rev Cancer* 12, 23-38.

- Mazzolini, R., Dopeso, H., Mateo-Lozano, S., Chang, W., Rodrigues, P., Bazzocco, S., Alazzouzi, H., Landolfi, S., Hernandez-Losa, J., Andretta, E., Alhopuro, P., Espin, E., Armengol, M., et al. (2012). Brush border myosin Ia has tumor suppressor activity in the intestine. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* *109*, 1530-1535.
- McConnell, R.E., Benesh, A.E., Mao, S., Tabb, D.L., and Tyska, M.J. (2011). Proteomic analysis of the enterocyte brush border. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* *300*, G914-926.
- McGuckin, M.A., Eri, R., Simms, L.A., Florin, T.H., and Radford-Smith, G. (2009). Intestinal barrier dysfunction in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis*, *15*, 100-113.
- Medema, J.P., and Vermeulen, L. (2011). Microenvironmental regulation of stem cells in intestinal homeostasis and cancer. *Nature* *474*, 318-26.
- Miller, H., Zhang, J., Kuolee, R., Patel, G., and Chen, W. (2007). Intestinal M cells: the fallible sentinels? *World J. Gastroenterol.* *13*, 1477-1486.
- Miller, R.K., and McCrea, P.D. (2010). Wnt to build a tube: Contributions of Wnt signaling to epithelial tubulogenesis. *Dev. Dyn.* *239*, 77-93.
- Miotto, E., Sabbioni, S., Veronese, A., Calin, G.A., Gullini, S., Liboni, A., Gramantieri, L., Bolondi, L., Ferrazzi, E., Gafà, R., Lanza, G., and Negrini, M. (2004). Frequent aberrant methylation of the CDH4 gene promoter in human colorectal and gastric cancer. *Cancer Res.* *64*, 8156-8159.
- Miyatani, S., Shimamura, K., Hatta, M., Nagafuchi, A., Nose, A., Matsunaga, M., Hatta, K., and Takeichi, M. (1989). Neural cadherin: role in selective cell-cell adhesion. *Science* *245*, 631-635.
- Miyazono, K., Maeda, S., and Imamura, T. (2005). BMP receptor signaling: transcriptional targets, regulation of signals, and signaling cross-talk. *Cytokine Growth Factor Rev.* *16*, 251-263.
- Miyoshi, Y., Nagase, H., Ando, H., Horii, A., Ichii, S., Nakatsuru, S., Aoki, T., Miki, Y., Mori, T., and Nakamura, Y. (1992). Somatic mutations of the APC gene in colorectal tumors: mutation cluster region in the APC gene. *Hum. Mol. Genet.* *1*, 229-233.
- Montorsi, L., Parenti, S., Losi, L., Ferrarini, F., Gemelli, C., Rossi, A., Manco, G., Ferrari, S., Calabretta, B., Tagliafico, E., Zanocco-Marani, T., and Grande, A. (2016). Expression of mu-protocadherin is negatively regulated by the activation of the beta-catenin signaling pathway in normal and cancer colorectal enterocytes. *Cell Death Dis* *7*: e2263
- Morali, O.G., Delmas, V., Moore, R., Jeanney, C., Thiery, J.P., and Larue, L. (2001). IGF-II induces rapid beta-catenin relocation to the nucleus during epithelium to mesenchyme transition. *Oncogene* *20*, 4942-4950.
- Moran, A.E., Hunt, D.H., Javis, S.H., Redston, M., Carothers, A.M., and Bertagnolli, M.M. (2004). Apc deficiency is associated with increased Egfr activity in the intestinal enterocytes and adenomas of C57BL/6J-Min/+ mice. *J Biol Chem* *279*, 43261-43272.
- Morgan, R.G. (1989). Leucovorin enhancement of the effects of the fluoropyrimidines on thymidylate synthase. *Cancer* *63*, 1008-1012.
- Morris L., Kaufman A., Gong Y., Ramaswami D., Walsh L., Turcan Ş., Eng S., Kannan K., Zou Y., Peng L., Banuchi V., Paty P., Zeng Z., Vakiani E., Solit D., Singh B., Ganly I., Liao L., Cloughesy T., Mischel P., Mellinghoff I., and Chan T. (2013) Recurrent somatic mutation of FAT1 in multiple human cancers leads to aberrant Wnt activation. *Nat Genet.* *45*, 253-261.
- Moulton, D.E., Crandall, W., Lakhani, R., and Lowe, M.E. (2004). Expression of a novel cadherin in the mouse and human intestine. *Pediatr. Res.* *55*, 927-934.

-N-

- Nam, J.S., Turcotte, T.J., Smith, P.F., Choi, S., and Yoon, J.K. (2006). Mouse Crispin/R-spondin family proteins are novel ligands for the Frizzled 8 and LRP6 receptors and activate β -catenin-dependent gene expression. *J. Biol. Chem.* *281*, 13247-13257.
- Niehrs, C. (2012). The complex world of WNT receptor signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *13*, 767-779.
- Noah, T., Donahue, B., and Shroyer, N. (2011). Intestinal development and differentiation. *Exp. Cell Res.* *317*, 2702-2710.
- Nose, A., and Takeichi, M. (1986). A novel cadherin cell adhesion molecule: its expression patterns associated with implantation and organogenesis of mouse embryos. *J Cell Biol.* *103*, 2649-2658.

-O-

- O'Connell, M.J., Lavery, I., Yothers, G., Paik, S., Clark-Langone, K.M., Lopatin, M., Watson, D., Baehner, F.L., Shak, S., Baker, J., Cowens, J.W., and Wolmark, N. (2010). Relationship between tumor gene expression and recurrence in four independent studies of patients with stage II/III colon cancer treated with surgery alone or surgery plus adjuvant fluorouracil plus leucovorin. *J Clin Oncol* *28*, 3937-3944.
- Odes, H.S., Fich, A., Reif, S., Halak, A., Lavy, A., Keter, D., Eliakim, R., Paz, J., Brodie, E., Niv, Y., Ron, Y., Villa, Y., Arber, N., and Gilat, T. (2001). Effects of current cigarette smoking on clinical course of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Dig Dis Sci.* *46*, 1717-1721.
- Okazaki, N., Takahashi, N., Kojima, S., Masuho, Y., and Koga, H. (2002). Protocadherin LKC, a new candidate for a tumor suppressor of colon and liver cancers, its association with contact inhibition of cell proliferation. *Carcinogenesis* *23*, 1139-1148.
- Onder, T.T., Gupta, P.B., Mani, S.A., Yang, J., Lander, E.S., and Weinberg, R.A. (2008). Loss of E-cadherin promotes metastasis via multiple downstream transcriptional pathways. *Cancer Res.* *68*, 3645-3654.
- Ose, R., Yanagawa, T., Ikeda, S., Ohara, O., and Koga, H. (2009). PCDH24-induced contact inhibition involves downregulation of beta-catenin signaling. *Mol Oncol.* *3*, 54-66.

-P-

- Palomaki, G.E., McClain, M.R., Melillo, S., Hampel, H.L., and Thibodeau, S.N. (2009). EGAPP supplementary evidence review: DNA testing strategies aimed at reducing morbidity and mortality from Lynch syndrome. *Genet. Med. Off. J. Am. Coll. Med. Genet.* *11*, 42-65.
- Pan, D. (2010). The hippo signaling pathway in development and cancer. *Dev. Cell* *19*, 491-505.
- Parenti, S., Ferrarini, F., Zini, R., Montanari, M., Losi, L., Canovi, B., Ferrari, S., and Grande, A. (2010). Mesalazine inhibits the beta-catenin signalling pathway acting through the upregulation of mu-protocadherin gene in colorectal cancer cells. *Aliment Pharmacol Ther.* *31*, 108-119.
- Parisini, E., Higgins, J.M., Liu, J.H., Brenner, M.B., and Wang, J.H. (2007). The crystal structure of human E-cadherin domains 1 and 2, and comparison with other cadherins in the context of adhesion mechanism. *J Mol Biol.* *373*, 401-411.
- Parsons, D.W., Wang, T.-L., Samuels, Y., Bardelli, A., Cummins, J.M., DeLong, L., Silliman, N., Ptak, J., Szabo, S., Willson, J.K.V., Markowitz, S., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., Lengauer, C., and Velculescu, V.E. (2005). Colorectal cancer: Mutations in a signalling pathway. *Nature* *436*, 792-792.

- Patel, S.D., Ciatto, C., Chen, C.P., Bahna, F., Rajebhosale, M., Arkus, N., Schieren, I., Jessell, T.M., Honig, B., Price, S.R., and Shapiro, L. (2006). Type II cadherin ectodomain structures: implication for classical cadherin specificity. *Cell* 124, 1255-1268.
- Pece, S., and Gutkind, J.S. (2000). Signaling from E-cadherins to the MAPK pathway by the recruitment and activation of epidermal growth factor receptors upon cell-cell contact formation. *J Biol Chem.* 275, 41227-41233.
- Peters, L.L., Lu, F. M., Eicher, E.M., Higgins, A., Yialamas, M., Turtzo, L.C., Otsuka, A.J., and Lux, S.E. (1995). Ank 3 (epithelial ankyrin), a widely distributed new member of the ankyrin gene family and the major ankyrin in kidney, is expressed in alternatively spliced forms, including forms that lack the repeat domain. *J. Bio. Chem.* 130, 313-330.
- Phelip, J.M., Benhaim, L., Bouché, O., Christou, N., Desolneux, G., Dupré, A., Léonard, D., Michel, P., Penna, C., Rousseaux, B., Tougeron, D., et Tournigand, C. (2019). Cancer colorectal métastatique. Thésaurus National de Cancérologie Digestive. [<http://www.tncd.org>]
- Philippova, M., Banfi, A., Ivanov, D., Gianni-Barrera, R., Allenspach, R., Erne, P., and Resink, T. (2006). Atypical GPI-anchored T-cadherin stimulates angiogenesis in vitro and in vivo. *Arteriocler Thromb Vasc Biol.* 26, 2222-2230.
- Piccolo, S., Dupont, S., and Cordenonsi, M. (2014). The biology of YAP/TAZ: hippo signaling and beyond. *Physiol. Rev.* 94, 1287-1312.
- Pinsk, V., Lemberg, D.A., Grewal, K., Barker, C.C., Schreiber, R.A., and Jacobson, K. (2007). Inflammatory bowel disease in the South Asian pediatric population of British Columbia. *Am J Gastroenterol*, 102, 1077-1083.
- Ponz de Leon, M., Varesco, L., Benatti, P., Sassatelli, R., Izzo, P., Scarano, M.I., Rossi, G.B., Di Gregorio, C., Gismondi, V., Percesepe, A., de Rosa, M., and Roncucci, L. (2001). Phenotype-genotype correlations in an extended family with adenomatosis coli and an unusual APC gene mutation. *Dis. Colon Rectum* 44, 1597-1604.
- Potten, C.S., Kovacs, L., and Hamilton, E. (1974). Continuous labelling studies on mouse skin and intestine. *Cell Tissue Kinet.* 7, 271-283.
- Potten, C.S. (1977). Extreme sensitivity of some intestinal crypt cells to X and gamma irradiation. *Nature* 269, 518-521.

-Q-

- Qian, X., Karpova, T., Sheppard, A.M., McNally, J., and Lowy, D.R. (2004). E-cadherin-mediated adhesion inhibits ligand-dependent activation of diverse receptor tyrosine kinases. *EMBO J.* 23, 1739-1748.

-R-

- Radinsky, R., Risin, S., Fan, D., Dong, Z., Bielenberg, D., Bucana, C.D., and Fidler, I.J. (1995). Level and function of epidermal growth factor receptor predict the metastatic potential of human carcinoma cells. *Clin Cancer Res.* 1, 19-31.
- Rattner, A., Hsieh, J.-C., Smallwood, P.M., Gilbert, D.J., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., and Nathans, J. (1997). A family of secreted proteins contains homology to the cysteine-rich ligand-binding domain of frizzled receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 2859-2863.
- Reya, T., and Clevers, H. (2005). Wnt signalling in stem cells and cancer. (Review). *Nature* 434, 843-850.
- Roux, K.J., Kim, D.I., Burke, B., and May, D.G. (2018). BioID: A Screen for Protein-Protein Interactions. *Curr Protoc Protein Sci* 91:19.23.1.

• Van Roy, F. (2014). Beyond E-cadherin: roles of other cadherin superfamily members in cancer, *Nature* 14, 121-134.

• Roszko, I., Sawada, A., and Solnica-Krezel, L. (2009). Regulation of convergence and extension movements during vertebrate gastrulation by the Wnt/PCP pathway. *Semin. Cell Dev. Biol.* 20, 986-997.

-S-

• Sanchez-Tillo, E., de Barrios, O., Valls, E., Darling, D.S., Castells, A., and Postigo, A. (2015). ZEB1 and TCF4 reciprocally modulate their transcriptional activities to regulate Wnt target gene expression. *Oncogene* 34, 5760-5770.

• Sauer, T., Guren, M.G., Noren, T., and Dueland, S. (2005). Demonstration of EGFR gene copy loss in colorectal carcinomas by fluorescence in situ hybridization (FISH): a surrogate marker for sensitivity to specific anti-EGFR therapy? *Histopathology* 47, 560-564.

• Sawa, M., Masuda, M., and Yamada, T. (2016). Targeting the Wnt signaling pathway in colorectal cancer. (Review). *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 20, 419-429.

• Sato, T., Vries, R.G., Snippert, H.J., van de Wetering, M., Barker, N., Stange, D.E., van Es, J.H., Abo, A., Kujala, P., Peters, P.J., et al. (2009). Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature* 459, 262-265.

• Sato, T., van Es, J.H., Snippert, H.J., Stange, D.E., Vries, R.G., van den Born, M., Barker, N., Shroyer, N.F., van de Wetering, M., and Clevers, H. (2011). Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts. *Nature* 469, 415-418.

• Schwitalla, S., Fingerle, A.A., Cammareri, P., Nebelsiek, T., Göktuna, S.I., Ziegler, P.K., Canli, O., Heujmans, J., Huels, D.J., Moreaux, G., Rupec, R.A., Gerhard, M., et al. (2013). Intestinal tumorigenesis initiated by dedifferentiation and acquisition of stem-cell-like properties. *Cell* 152, 25-38.

• Schlegel, N., Meir, M., Heupel, W., Holthöfer, B., Leube, R., and Waschke, J. (2010). Desmoglein 2-mediated adhesion is required for intestinal epithelial barrier integrity. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 298, G774-783.

• Schneider, M.R., Dahlhoff, M., Horst, D., Hirschi, B., Trülzsch, K., Müller-Höcker, J., Vogelmann, R., Allgäuer, M., Gerhard, M., Steininger, S., Wolf, E., and Kolligs, F.T. (2010). A key role for E-cadherin in intestinal homeostasis and Paneth cell maturation. *PLoS One* 5(12): e14325.

• Schreibman, I.R., Baker, M., Amos, C., and McGarrity, T.J. (2005). The hamartomatous polyposis syndromes: a clinical and molecular review. *Am. J. Gastroenterol.* 100, 476-490.

• Sharma, P., and McNeill, H. (2013). Regulation of long-range planar cell polarity by Fat-Dachsous signaling. *Development* 140, 3869-3881.

• Shih, M., Wang, T.L., Traverso, G., Romans, K., Hamilton, S.R., Ben-Sasson, S., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (2001). Top-down morphogenesis of colorectal tumors. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 98, 2640-2645.

• Sobrero, A., and Bannicelli, E. (2010). Chemotherapy: which drug and when? (symposium article). *Annals of Oncology* 21, vii130-vii133.

• Solanas, G., and Batlle, E. (2011). Control of cell adhesion and compartmentalization in the intestinal epithelium. *Exp. Cell Res.* 317, 2695-2701.

- Sorscher, S.M., Green, M.R., and Feramisco, J.R. (1995). Enhanced E-cadherin expression in epidermal growth factor receptor expressing cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 206, 518-524.
- Sparks, A.B., Morin, P.J., Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. (1998). Mutational analysis of the APC/beta-catenin/Tcf pathway in colorectal cancer. *Cancer Res.* 58, 1130-1134.
- Spehlmann M.E., Begun A.Z., Burghardt, J., Lepage, P., Raedler, A., and Schreiber, S. (2008). Epidemiology of inflammatory bowel disease in a German twin cohort: results of a nationwide study. *Inflamm. Bowel Dis.* 14, 968-976.

-T-

- Takeichi, M. (1977). Functional correlation between cell adhesive properties and some cell surface proteins. *J Cell Biol.* 75, 464-474.
- Tan, H.L., Glen, E., Töpf, A., Hall, D., O'Sullivan, J.J., Sneddon, L., Wren, C., Avery, P., Lewis R.J., ten Dijke, P., Arthur, H.M., Goodship, J.A., Keavney, B.D. (2012). Nonsynonymous variants in the *SMAD6* gene predispose to congenital cardiovascular malformation. *Human Mutation* 33, 720-727.
- Taneyhill, L.A. (2008). To adhere or not to adhere: the role of Cadherins in neural crest development. *Cell Adh Migr.* 2, 223-230.
- Tetsu, O., and McCormick, F. (1999). Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* 398, 422-426.
- Thiery, J.P. (2002). Epithelial-Mesenchymal transitions in tumour progression. (Review). *Nat Rev Cancer* 2,442-454.
- Tian, H., Biehs, B., Warming, S., Leong, K., Rangell, L., Klein, O., and de Sauvage, F. (2011). A reserve stem cell population in small intestine renders Lgr5-positive cells dispensable. *Nature* 478, 255-259.
- Torres, J., Mehandru, S., Colombel, J.F., and Peyrin-Biroulet, L. (2017). Crohn's disease. *Lancet* 389, 1741-1755.
- Toyota, M., Ahuja, N., Ohe-Toyota, M., Herman, J., Baylin, S., and Issa, J. (1999). CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 8681-8686.
- Toyooka, K.O., Toyooka, S., Virmani, A.K., Sathyanarayana, U.G., Euhus, D.M., Gilcrease, M., Minna, J.D., and Gazdar, A.F. (2001). Loss of expression and aberrant methylation of the *CDH13* (H-cadherin) gene in breast and lung carcinomas. *Cancer Res* 61, 4556-45560.
- Toyooka S., Toyooka K., Harada K., Miyajima K., Makarla P., Sathyanarayana U., Yin J., Sato F., Shivapurkar N., Meltzer S., and Gazdar A. (2002) Aberrant methylation of the *CDH13* (H-cadherin) promoter region in colorectal cancers and adenomas. *Cancer Res.* 62, 3382-3386.
- Tremaroli, V., and Bäckhed, F. (2012). Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. (Review). *Nature* 489, 242-249.

-U-

- Ungaro, R., Mehandru, S., Allen, P., Peyrin-Biroulet, L., and Colombel, J.F. (2017). Ulcerative colitis. *Lancet* 389, 1756-1770.

-V-

- Vasen, H., Watson, P., Mecklin, J., and Lynch, H. (1999). New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC. *Gastroenterology* *116*, 1453-1456.
- Viennot, S., Deleporte, A., Moussata, D., Nancey, S., Flourié, B., and Reimund, J.M. (2009). Colon cancer in inflammatory bowel disease: recent trends, questions and answers. *Gastroenterol. Clin. Biol.* *33*, 190-201.
- Vermeulen, L., and Snippert, H.J. (2014). Stem cell dynamics in homeostasis and cancer of the intestine. *Nat. Rev. Cancer* *14*, 468-480.
- Vooijs, M., Liu, Z., and Kopan, R. (2011). Notch: architect, landscaper, and guardian of the intestine. *Gastroenterology* *141*, 448-459.

-W-

- Walker, A.W., Sanderson, J.D., Churcher, C., Parkes, G.C., Hudspith, B.N., Rayment, N., Brostoff, J., Parkhill, J., Dougan, G., and Petrovska, L. (2011). High-throughput clone library analysis of the mucosa-associated microbiota reveals dysbiosis and differences between inflamed and non-inflamed regions of the intestine in inflammatory bowel disease. *BMC Microbiol.* *11*:7.
- Walther, A., Johnstone, E., Swanton, C., Midgley, R., Tomlinson, I., and Kerr, D. (2009). Genetic prognostic and predictive markers in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer.* *9*, 489-99.
- Wang, R., Green, J., Wang, Z., Deng, Y., Qiao, M., Peabody, M., Zhang, Q., Ye, J., Yan, Z., Denduluri, S., et al. (2014). Bone Morphogenetic Protein (BMP) signaling in development and human diseases. *Genes Dis.* *1*, 87-105.
- Wang, T., Abou-Ouf, H., Hegazy, S.A., Alshalalfa, M., Stoletov, K., Lewis, J., Donnelly, B., and Bismar, T.A. (2016). Ankyrin G expression is associated with androgen receptor stability, invasiveness, and lethal outcome in prostate cancer patients. *J. Mol. Med.* *94*, 1411-1422.
- Wheeler, J.M., Kim, H.C., Efstathiou, J.A., Ilyas, M., Mortensen, N.J., Bodmer, W.F. (2001). Hypermethylation of the promoter region of the E-cadherin gene (CDH1) in sporadic and ulcerative colitis associated colorectal cancer. *Gut* *48*, 367-371.
- Williams, E.J., Furness, J., Walsh, F.S., and Doherty, P. (1994). Activation of the FGF receptor underlies neurite outgrowth stimulated by L1, N-CAM, and N-cadherin. *Neuron* *13*, 583-594.
- Wong, N.A., and Pignatelli, M. (2002). Beta-catenin—a linchpin in colorectal carcinogenesis? (Review). *Am J Pathol.* *160*, 389-401.

-X-

- Xavier, R.J., and Podolsky, D.K. (2007). Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. (Review). *Nature* *118*, 427-434.
- Xia, Z., Huang, M., Zhu, Q., Li, Y., Ma, Q., Wang, Y., Chen, X., Li, J., Qiu, L., Zhang, J., Zheng, J., and Lu B. (2019). Cadherin related family member 2 acts as a tumor suppressor by inactivating AKT in human hepatocellular carcinoma. *J Cancer* *10*, 864-873.
- Xu, Q., Wang, Y., Dabdoub, A., Smallwood, P.M., Williams, J., Woods, C., Kelley, M.W., Jiang, L., Tasman, W., Zhang, K., and Nathans, J. (2004). Vascular development in the retina and inner ear: control by Norrin and Frizzled-4, a high-affinity ligand-receptor Pair. *Cell* *116*, 883-895.

-Y-

- Yan, K., Chia, L.A., Li, X., Ootani, A., Su, J., Lee, J.Y., Su, N., Luo, Y., Heilshorn, S.C., Amieva M. R., Sangiorgi, E., Capecchi, M.R., and Kuo C.J. (2012). The intestinal stem cell markers Bmi1 and Lgr5 identify two functionally distinct populations. *PNAS* 109, 466-471.
- Yang, Q., Bermingham, N.A., Finegold, M.J., and Zoghbi, H.Y. (2001). Requirement of Math1 for secretory cell lineage commitment in the mouse intestine. *Science* 294, 2155-2158.
- Yashiro, M., Carethers, J.M., Laghi, L., Saito, K., Slezak, P., Jaramillo, E., Rubio, C., Koizumi, K., Hirakawa, K., and Boland, C.R. (2001). Genetic pathways in the evolution of morphologically distinct colorectal neoplasms. *Cancer Res.* 61, 2676-2683.

-Z-

- Ziv, E., and Bendayan, M. (2000). Intestinal absorption of peptides through the enterocytes. *Microsc. Res. Tech.* 49, 346-352.
- Zwijsen, A., Verschuere, K., and Huylebroeck, D. (2003). New intracellular components of bone morphogenetic protein/Smad signaling cascades. *FEBS Lett.* 546, 133-139.

PUBLICATIONS & COMMUNICATIONS

Formations & Enseignement

I - Publications

Publication 1

- Beck M.^{*}, Baranger M.^{*}, Moufok-Sadoun A., Bersuder E., Hinkel I., Mellitzer G., Martin E., Duluc I., De Reynies A., Freund J.N., Gross I. The Atypical Cadherin MUCDHL antagonizes colon cancer and inhibits β -Catenin signaling through multiple mechanisms. *En préparation*

Publication 2

- Beck M., Martin E., Delhorme J.B., Bersuder E., Le Com L., Reimund J.M., Freund J.N., Gross I. A specific isoform of the adapter protein ANK3 regulates the activity and stability of the atypical Cadherin MUCDHL in the intestine. *En préparation*

Publication 3

- Baranger M.^{*}, Moufok-Sadoun A.^{*}, Le May C., Crawley S.W., Bersuder E., Beck M., Martin E., Demignot S., Mellitzer G., Tyska M.J., Freund J.N., Gross I. Brush border Cadherin MUCDHL controls the digestive metabolism. *En préparation*

II - Communications orales

Beck Marine, Martin Elisabeth, Delhorme Jean-Baptiste, Bersuder Emilie, Le Com Laura, Reimund Jean-Marie, Freund Jean-Noël, Gross Isabelle. ANK3 est un régulateur de l'activité de la Cadherine atypique MUCDHL. Mars 2019 - CECED - Toulouse - **Prix de la meilleure communication**

Beck Marine^{*}, Baranger Mathilde^{*}, Mellitzer Georg, Martin Elisabeth, Duluc Isabelle, De Reynies A., Freund Jean-Noël & Gross Isabelle. L'implication de la Cadherine Atypique MUCDHL dans la tumorigenèse colique. Novembre 2018 - Cancéropôle Grand-EST - Reims

Formations & Enseignement

Beck Marine^{*}, Baranger Mathilde^{*}, Mellitzer Georg, Martin Elisabeth, Duluc Isabelle, De Reynies A., Freund Jean-Noël & Gross Isabelle. L'implication de la Cadherine Atypique MUCDHL dans la tumorigenèse colique. Avril 2018 - FMST - Strasbourg - **Prix de la meilleure communication**

Beck Marine^{*}, Baranger Mathilde^{*}, Mellitzer Georg, Marisa Laetitia, Martin Elisabeth, Duluc Isabelle, De Reynies A., Freund Jean-Noël & Gross Isabelle. La Cadherine Atypique MUCDHL s'oppose à la tumorigenèse colique et inhibe la β -caténine de manière non classique. Mars 2018 - CECED - Marseille

Beck Marine^{*}, Baranger Mathilde^{*}, Mellitzer Georg, Marisa Laetitia, Martin Elisabeth, Duluc Isabelle, Freund Jean-Noël & Gross Isabelle. The atypical cadherin Mucdhl is decreased in the "cancer stem cell" molecular subtype of colon tumors and inhibits β -catenin signalling in a non-classical way. May 2017 - European Cancer Center - Bâle

Baranger Mathilde^{*}, Beck Marine^{*}, Mellitzer Georg, Marisa Laetitia, Martin Elisabeth, Duluc Isabelle, Freund Jean-Noël & Gross Isabelle. La Cadherine Atypique MUCDHL s'oppose à la tumorigenèse colique et inhibe la β -caténine de manière non classique. Mars 2016 - CECED - Lille

III - Posters

Beck Marine^{*}, Baranger Mathilde^{*}, Mellitzer Georg, Martin Elisabeth, Duluc Isabelle, De Reynies A., Freund Jean-Noël & Gross Isabelle. L'implication de la Cadherine Atypique MUCDHL dans la tumorigenèse colique. Novembre 2018 - Journées des Jeunes Chercheurs en Cancérologie - Fondation ARC - Paris

^{*} contribution équivalente

Marine BECK

IMPLICATION ET MODE D'ACTION DE LA CADHÉRINE ATYPIQUE MUCDHL DANS LA TUMORIGENÈSE INTESTINALE

Résumé

L'altération des mécanismes impliqués dans l'homéostasie intestinale peut conduire au développement de cancers colorectaux (CCR). Les CCR se situent au 2nd rang des décès par cancer en France et il est donc nécessaire d'améliorer nos connaissances pour mieux les soigner. L'objectif de ces travaux était de comprendre les mécanismes impliqués dans l'homéostasie intestinale par le biais de la Cadhérine atypique MUCDHL dont l'expression semble diminuée dans les CCR. Les conséquences de cette perte et le mode d'action de MUCDHL restent mal connus. Ainsi, l'étude d'une large cohorte de patients et d'un modèle murin a permis de confirmer que la perte de MUCDHL aggrave la tumorigenèse intestinale. De plus, la caractérisation de l'interaction entre MUCDHL et la β -caténine a montré que le mode d'action de MUCDHL est plus complexe qu'une simple séquestration membranaire de la β -caténine impliquant différentes voies de signalisation. Enfin ces travaux ont permis d'identifier des interactants de MUCDHL. Les résultats montrent pour la première fois le rôle de suppresseur de tumeurs de MUCDHL dans le côlon et apportent des informations sur sa régulation et son mode d'action.

Mots clés : MUCDHL, Cadhérines, cancer colorectal, voies de signalisation

Summary

The alteration of mechanisms involved in intestinal homeostasis leads to the development of colorectal cancer (CRC). In France, CRC is the second leading cause of cancer mortality, and it is therefore necessary to improve our knowledge to treat it better. The objective of this project was to understand more precisely mechanisms involved in intestinal homeostasis through the atypical Cadherin MUCDHL whose expression seems decreased in CRC. However, the consequences of this loss, as well as the mode of action and the molecular relays of MUCDHL were largely unknown. Thus, the study of a large cohort of patients and of a murine model confirmed that the loss of MUCDHL enhances intestinal tumorigenesis. In addition, the functional characterization of the interaction between MUCDHL and β -catenin showed that the mode of action of MUCDHL is more complex than a simple membrane sequestration of β -catenin involving different signaling pathways. Finally, new interactants of MUCDHL were identified. The results obtained through this work show, for the first time, the tumor suppressor role of MUCDHL in the colon, and provide informations about its regulation and mode of action.

Key words: MUCDHL, Cadherins, colorectal cancer, signaling pathways