

Université de Sherbrooke

Rôle de la voie KRAS/ERK MAP kinase dans la différenciation, la transformation et la tumorigénèse des cellules de l'épithélium intestinal.

Par
Etienne Lemieux
Programme de biologie cellulaire

Thèse présentée à la Faculté de médecine et des sciences de la santé
en vue de l'obtention du grade de philosophia doctor (Ph.D)
en biologie cellulaire

Sherbrooke, Québec, Canada
Janvier 2014

Membres du jury d'évaluation

P^{re} Nathalie Rivard, Département d'anatomie et de biologie cellulaire
P^r Fernand-Pierre Gendron, Département d'anatomie et de biologie cellulaire
P^r Benoit Chabot, Département de microbiologie et d'infectiologie
P^r Sylvain Meloche, Département de pharmacologie, Faculté de médecine,
Université de Montréal

© Etienne Lemieux, 2014

[Dédicace]

À la mémoire de mon frère,

« Faire une Thèse signifie souvent mettre ses proches de côté quelque temps. Aujourd'hui ce temps n'a pas de prix. Pour que cela n'ait pas été vain, je te dédie ce travail frère »

[Remerciements]

Cette thèse a vu le jour grâce à la direction éclairée de Pre. Nathalie Rivard, dont j'ai sans cesse pu apprécier les conseils et la grande rigueur; merci pour ces années.

J'aimerais également remercier les professeurs Fernand-Pierre Gendron, Benoit Chabot et Sylvain Meloche d'avoir accepté de faire partie du Jury. J'aimerais vivement remercier les professeurs François Boudreau, Nathalie Perrault, Fernand-Pierre Gendron et Claude Asselin pour leurs conseils et ces nombreuses discussions sur la science, la vie et la course à pied.

J'aimerais également saluer et remercier chacun des étudiants et membres du département d'Anatomie et biologie cellulaire, un très beau département avec des collègues et des amis avec qui j'ai eu beaucoup de plaisir.

Rôle de la voie KRAS/ERK MAP kinase dans la différenciation, la transformation et la tumorigénèse des cellules de l'épithélium intestinal.

Par Etienne Lemieux, Département d'anatomie et de biologie cellulaire

Thèse présentée à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention du grade de philosophia doctor (Ph.D) en biologie cellulaire, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Québec, Canada

Le cancer colorectal est issu des cellules de l'épithélium et se définit comme une pathologie induite par une accumulation d'altérations génétiques. Des mutations de type gain-de-fonction dans les gènes *KRAS*, *NRAS* et *BRAF* sont retrouvées dans plus de 60% des cancers colorectaux entraînant potentiellement l'activation constitutive de la signalisation en aval, notamment le sentier MEK/ERK. Dans cette thèse, nous avons évalué les mécanismes moléculaires par lesquels l'activation du sentier MEK/ERK régularise la différenciation épithéliale et la tumorigénèse intestinale. Dans les cellules épithéliales intestinales (CEIs), nos résultats montrent que les kinases ERK1/2 doivent être inactivées pour permettre l'induction du processus de différenciation entérocytaire. En effet, l'expression d'une forme constitutive active de MEK1 (caMEK1) est suffisante pour bloquer la différenciation tant morphologique que fonctionnelle. Une augmentation de la phosphorylation du facteur de transcription Cdx2 sur la sérine 60, qui diminue son activité transcriptionnelle, constituerait un des mécanismes impliqués. Dans des cellules cryptales intestinales indifférenciées, l'expression du caMEK1 induit une transition épithélium-mésenchyme (EMT), un processus associé au cancer colorectal. Cette EMT confère aux CEIs des capacités invasives et métastatiques *in vivo* associées à la sécrétion de protéases extracellulaires (MMP2/9). Nous avons identifié plusieurs autres cibles moléculaires de l'activité MEK/ERK impliquées dans l'EMT et l'invasion tumorale. Nous avons démontré l'implication des cascades Fra-1/Snail2 et EGR-1/Snail1 dans la répression transcriptionnelle de la E-cadhérine, une étape clé de l'EMT. Ce mécanisme de répression est également présent dans les lignées cancéreuses colorectales humaines possédant la mutation oncogénique de *KRAS*. L'analyse comparative par micropuce d'ADN Affymetrix dans les CEIs transformées par caMEK1 a permis d'identifier le gène encodant pour la *serpineE2*, un inhibiteur de protéases, comme le gène le plus fortement induit. Nous avons démontré que la *serpineE2* est une cible moléculaire directe de l'activité oncogénique de la voie KRAS/BRAF/MEK/ERK et démontré son importance dans la migration et l'invasion tumorale par l'utilisation d'ARN interférents. On observe d'ailleurs une très forte expression de la *serpineE2* dans des tumeurs colorectales humaines en comparaison à la marge saine adjacente. Nous avons aussi démontré que la transformation des CEIs induite par l'expression des formes actives de *KRAS* ou de MEK1 stimule la voie signalisation Wnt/ β -caténine, dont la fréquente dérégulation constitue un évènement majeur menant au développement du cancer du côlon. La phosphorylation MEK-dépendante de LRP6 (S1490/T1572) semble être responsable de l'augmentation de l'activité transcriptionnelle de la β -caténine, associée à une augmentation de sa présence au noyau. Cette interconnexion entre les voies KRAS/MAP kinase et Wnt/ β -caténine a également été observée dans des cellules cancéreuses colorectales humaines mutées pour *KRAS* ou *BRAF*. Finalement, une augmentation du niveau de phosphorylation de LRP6 a été observée dans les adénomes et tumeurs colorectales humaines, supportant l'idée que la phosphorylation de LRP6 puisse être impliquée dans la progression tumorale. Mots-clés : **MEK, ERK, cancer colorectal, EMT, différenciation, invasion**

Table des matières

Introduction

1	Le tractus gastro-intestinal et l'épithélium intestinal.....	1
1.1	Morphologie, structure et unité fonctionnelle	1
1.2	La barrière épithéliale et l'expression des protéines de jonction.....	5
2	Renouvellement de l'épithélium intestinal et contrôle de la prolifération cryptale.....	7
2.1	Le cycle cellulaire	7
2.2	Les voies de signalisation impliquées dans le contrôle de la prolifération normale des cellules épithéliales intestinales	11
2.2.1	La voie de signalisation Wnt/ β -caténine	12
2.2.2	La voie de signalisation des MAP kinases ERK1/ERK2.....	15
2.2.3	La voie de signalisation PI3K/Akt.....	20
3	La différenciation entérocytaire	22
3.1	Rôle du facteur de transcription Cdx2 dans la différenciation entérocytaire	23
3.2	Régulation de la voie RAS/RAF/MEK/ERK lors de la différenciation entérocytaire	24
4	Les cancers du côlon.....	25
4.1	Statistiques et épidémiologie du cancer colorectal.....	25
4.2	Propriétés cellulaires menant au développement du cancer colorectal	26
4.2.1	Implication de l'instabilité génomique et de la méthylation de l'ADN dans la carcinogénèse colorectale.	28
4.2.2	La séquence adénome-carcinome dans les cancers du côlon.....	29
4.2.3	La transition épithélio-mésenchymateuse	32
4.2.4	Angiogenèse et formation de métastases	36
4.3	Implication de la voie Wnt/ β -caténine dans la tumorigénèse intestinale.	37
4.4	Implication de la voie RAS/ERK MAP kinase dans la tumorigénèse intestinale.	39
4.5	Implication de la signalisation dépendante de MEK dans la transformation des CEIs normales en culture.....	43
5	Hypothèses et objectifs	44

Résultats

Manuscrit 1.	Constitutive activation of MEK/ERK pathway inhibits intestinal epithelial cell differentiation.....	47
Manuscrit 2.	Constitutively active MEK1 is sufficient to induce epithelial-to-mesenchymal transition in intestinal epithelial cells and to promote tumor invasion and metastasis.....	78
Manuscrit 3.	The serine protease inhibitor serpinE2 is a novel target of ERK signaling involved in human colorectal tumorigenesis.....	117

Manuscrit 4. Oncogenic KRAS signalling promotes Wnt/ β -catenin pathway through LRP6 in colorectal cancer.....	150
---	-----

Discussion

1 Rôle du sentier MAP kinase dans le contrôle du statut prolifération-différenciation de l'épithélium intestinal.....	187
1.1 L'hyperactivation de la signalisation MEK/ERK bloque la différenciation morphologique ainsi que l'expression des marqueurs de différenciation spécifiques à l'épithélium intestinal.....	188
1.2 Mécanisme de répression de la différenciation entérocytaire médiée par l'activité MEK.....	190
2 Rôle de la voie KRAS/ERK MAP kinase dans la carcinogénèse colorectale..	193
2.1 Régulation de Cdx2 par la signalisation MEK/ERK, implication potentielle dans la tumorigénèse colorectale.....	194
2.2 Implication de MEK1 dans l'induction d'une transition épithélium-mésenchyme dans les cellules épithéliales intestinales (Manuscrit 2).....	196
2.3 Implication de la voie MEK/ERK dans les processus d'invasion tumorale et de formation de métastases.....	199
2.4 Régulation des facteurs de transcription Snail1 et Snail2 dans l'EMT induite par l'hyperactivation de MEK1.....	202
2.5 Identification des gènes différentiellement exprimés suite à l'activation constitutive de MEK1.....	205
2.5.1 Rôle et implication de la serpineE2 comme cible de l'activité oncogénique de RAS/ERK (Manuscrit 3).....	205
2.5.2 Implication potentielle de la serpineE2 dans le contrôle de l'angiogénèse tumorale?.....	209
3 Implication de la voie Wnt/β-caténine dans la transformation induite par la voie KRAS/ERK MAP kinase.....	210
3.1 Contrôle de l'activité du complexe β -caténine/TCF4 par l'activité MEK/ERK..	211
3.2 L'activité du complexe β -caténine/TCF4 participe au potentiel tumorigénique de MEK1.....	213
3.3 Mécanisme de régulation de l'activité du complexe β -caténine/TCF4 par l'activation constitutive de MEK1.....	215
4 Régulation des isoformes de ERK1 par les formes oncogéniques de KRAS et de MEK1.....	220
5 L'utilisation de kinases MEKs et ERKs en tant des cibles pharmacologiques dans le traitement du cancer colorectal?	222
6 Conclusions et perspectives.....	225

Liste des figures

<i>Figure 1 - Architecture de l'intestin grêle et du côlon.....</i>	<i>1</i>
<i>Figure 2 - L'axe crypte-villosité de l'intestin grêle et l'axe cryptal du colon.....</i>	<i>3</i>
<i>Figure 3 - Complexes de jonction des cellules épithéliales intestinales.....</i>	<i>6</i>
<i>Figure 4 - Régulation du cycle cellulaire par les complexes Cyclines/Cdk.....</i>	<i>9</i>
<i>Figure 5 – La voie de signalisation Wnt/β-caténine.....</i>	<i>12</i>
<i>Figure 6- Les voies de signalisation des MAP kinases.....</i>	<i>16</i>
<i>Figure 7- La voie de signalisation PI3K/Akt.....</i>	<i>21</i>
<i>Figure 8 - Propriétés cellulaires menant au développement du cancer.....</i>	<i>27</i>
<i>Figure 9 - Modèle de la carcinogénèse colorectale.....</i>	<i>30</i>
<i>Figure 10- Implication de l'EMT dans l'invasion et la formation de métastases.....</i>	<i>33</i>
<i>Annexe I : pCdx2/S60 dans les lignées cancéreuses colorectales humaines.</i>	<i>263</i>
<i>Annexe II : Rôle de la serpineE2 dans l'angiogenèse tumorale.....</i>	<i>264</i>
<i>Annexe III : Représentation schématique des trois isoformes de ERK1.....</i>	<i>265</i>
<i>Annexe IV : Effet de l'expression des formes oncogéniques de KRAS et de MEK1 sur la phosphorylation des kinases ERK1/2.....</i>	<i>265</i>
<i>Annexe V : Impact de la baisse d'expression de ERK1b dans les cellules IEC-6 transformées par l'activation constitutive de MEK1.</i>	<i>266</i>
<i>Annexe VI : Contribution d'ERK1b à la transformation cellulaire induite par l'activation oncogénique de la voie KRAS/MAP kinase.</i>	<i>267</i>
<i>Annexe VII : Expression relative d'ERK1c, en comparaison avec ERK1, dans des tumeurs colorectales humaines.</i>	<i>268</i>

Liste des abréviations

ADAM : A disintegrin and metalloproteinase domain

AJ : Adherens junctions

AP : Alkaline phosphatase

APC : Adenomatous polyposis coli

BMPR1A : Bone morphogenetic protein receptor IA

caMEK1 : Constitutive active MEK1

CEIs : Cellules épithéliales intestinales

CD : Common docking

Cdk : Cyclin-dependent kinases

Ci-R : Ci-répresseur

CIMP : CpG island methylator phenotype

CIN : Chromosomal instability

CK1 : Casein kinase 1

CSCs : Cellules souches cancéreuses

COX2 : Cyclooxygenase-2

DHFR : Dihydrofolate reductase

Dkk:1 : Dickkopf-1

DPPIV : Dipeptidyl-peptidase IV

DUSP : Dual specificity phosphatases

Dvl : Dishevelled

EGF : Epidermal growth factor

EGFR : Epidermal growth factor receptor

ERK1/2 : Extracellular signal-regulated kinase 1/2

ERK1b/1c : Extracellular signal-regulated kinase 1b/1c

EMT : Epithelial-mesenchymal transition

FAP : Familial adenomatous polyposis

Fra-1 : FOS-like antigen 1

FGF : Fibroblast growth factor

FGFR : Fibroblast growth factor receptor

GSK3 : Glycogen synthase kinase-3
GLP-2 : Glucagon-like peptide 2
HGF : Hepatocyte growth factor
HIEC : Human intestinal epithelial cells
HNPCC : Hereditary nonpolyposis colorectal cancer
IEC-6 : Intestinal epithelial crypt cells
IGF : Insuline-like growth factors
Ihh : Indian headgehog
INK4 : Inhibitor of Cdk4
ITF : Intestinal trefoil factor
JNK : c-Jun N-terminal kinases
JPS : Juvenile polyposis syndrome
KIM : Kinase interacting motif
KRAS : Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
LEF : Lymphoid enhancer binding factor
LDL : Low-density lipoprotein
LPH : Lactase-phlorizine hydrolase
MAML : Master mind like protein
MDCK : Mardin-Darby canine kidney
MEC : Matrice extracellulaire
MEF : Mouse embryonic fibroblasts
MEK1/2 : Mitogen-Activated Protein (MAP) kinase kinase 1/2
MKP : MAP kinase phosphatases
MLH1 : MutL homologue 1
MSI : Microsatellite instability
MMP:2 : Matrix metalloproteinases 2
MMP:9 : Matrix metalloproteinases 9
Muc2 : Mucin 2
NFκB : Nuclear factor kappa B
OPN : Osteopontin
PAI:1 : Plasminogen activator inhibitor (type-1)

PDGF : Platelet-derived growth factor

Phase G1 : Phase de préparation à la réplication de l'ADN

Phase G2 : Phase de préparation à la mitose

Phase M : Phase de la mitose

Phase S : Phase de réplication de l'ADN

G2 : Phase de préparation à la mitose

PI3K : Phosphatidylinositol 3-Kinase

PI3Kca : Sous-unité catalytique de la PI3K

PIP2 : Phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphates

PIP3 : Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphates

PKC : Protein kinase C

pRB : Protéine du rétinoblastome

PTEN : Phosphatase and tensin homolog

SI : Sucrase-isomaltase

uPA : Urokinase plasminogen activator

uPAR : Urokinase plasminogen activator receptor

TCF-4 : Transcription factor 4

TGF β : Transforming growth factor- β

TK : Thymidine kinase

TJ : Tight junction

VEGF : Vascular endothelial growth factor

wtMEK1 : Wild type MEK1

Introduction

1 Le tractus gastro-intestinal et l'épithélium intestinal

1.1 Morphologie, structure et unité fonctionnelle

Le tube digestif est un organe complexe qui assure les fonctions de digestion et d'absorption des aliments ingérés. L'intestin s'étend de l'estomac à l'anus et se divise en deux segments distincts, soit l'intestin grêle (duodénum, jéjunum et iléon) et le gros intestin (cecum, côlon et rectum). De l'œsophage jusqu'au gros intestin, le tube digestif des mammifères possède une paroi composée de quatre couches de tissus distincts, soit la muqueuse, la sous-muqueuse, la musculuse et la séreuse (Figure 1).

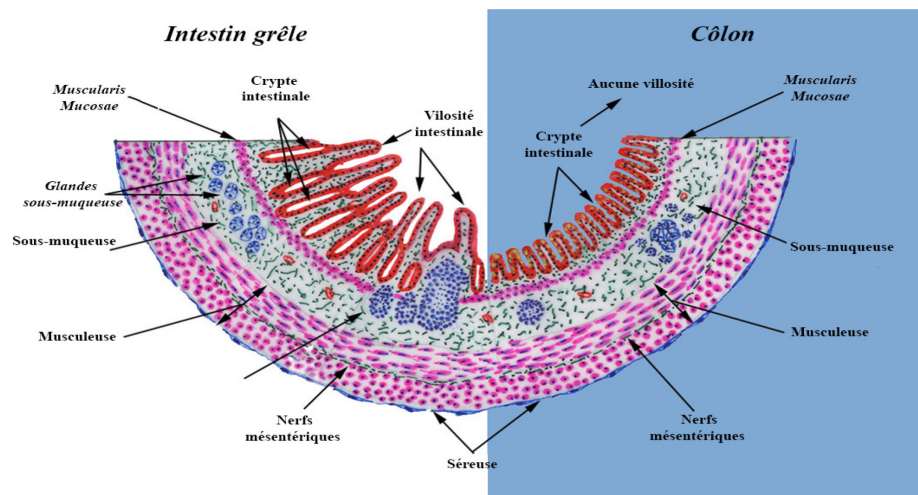


Figure 1 - Architecture de l'intestin grêle et du côlon

De l'œsophage au côlon, le tube digestif est constitué de quatre couches de tissus : la muqueuse (mucosa), la sous-muqueuse (sub-mucosa), la musculuse (muscularis externa) et la séreuse (serosa).

Tiré et modifié du site internet vetmed.vt.edu

La muqueuse tapisse l'intérieur de la paroi de l'intestin et est composée d'un épithélium simple cylindrique qui fait face à la lumière intestinale. S'ensuit la sous-muqueuse qui est une couche de tissu conjonctif composée de cellules fibroblastiques et d'un assemblage complexe de plusieurs composants de la matrice extracellulaire (MEC) traversée par un réseau de vaisseaux sanguins et de nerfs. Cette couche repose sur la musculuse qui est composée de deux couches de muscles lisses, où la couche externe permet une contraction

longitudinale et la couche interne une contraction circulaire. Par une action synchronisée (mouvements péristaltiques) de ces deux couches de muscles, la musculature permet de faire progresser le contenu du tube digestif du duodénum vers l'anus. En dernier lieu, la couche externe appelée séreuse ou adventice consiste en une gaine de tissu conjonctif qui recouvre la musculature et qui attache le mésentère à la cavité corporelle (Marieb, 1999). L'architecture de l'intestin grêle vise à augmenter la surface de contact entre le bol alimentaire et l'épithélium et ce, grâce à trois types de replis qui lui permettent d'augmenter la surface de contact avec la lumière intestinale. Tout d'abord, la muqueuse et la sous-muqueuse forment des valvules conniventes, qui sont des replis circulaires donnant un aspect houleux à la surface de l'épithélium. La muqueuse intestinale présente aussi des reliefs en «doigts de gants», qui sont des projections vers la lumière appelées villosités. Finalement, la membrane apicale possède de nombreux appendices microscopiques appelés microvillosités. Collectivement, ces minuscules saillies forment une structure qui porte le nom de bordure en brosse et permettent d'augmenter la surface d'absorption, mais également de porter des enzymes participant à la digestion terminale des sucres et des protéines avant leur absorption et transport dans la circulation sanguine (Marieb, 1999).

L'épithélium qui tapisse l'intérieur de l'intestin est un tissu en constant renouvellement; par exemple chez l'humain, cet épithélium est remplacé tous les 3 à 5 jours. Le maintien de ce tissu est assuré par un renouvellement rapide et dynamique grâce à la présence d'un compartiment prolifératif localisé dans la portion inférieure de la crypte. La villosité est le compartiment différencié et fonctionnel de l'intestin qui assure les fonctions spécialisées du tissu. Cette compartimentalisation cellulaire donne naissance à une architecture bien distincte qui forme l'unité fonctionnelle de l'intestin, soit l'axe crypte-villosité (Figure 2). Cet axe permet à la fois d'augmenter la surface d'absorption en plus d'assurer le renouvellement continu du tissu en protégeant les cellules souches contre l'environnement hostile du tube digestif. Les cellules souches sont confinées à la base des cryptes et par division vont engendrer une population de cellules progénitrices hautement prolifératives. Ces cellules-filles vont effectuer de 4 à 6 divisions (Bach et al., 2000) pour ensuite entamer un processus de différenciation cellulaire qui donnera naissance aux quatre types cellulaires différenciés qui composent l'épithélium intestinal. À l'exception des

cellules de Paneth, les cellules-filles migreront de façon ascendante le long de l'axe cryptal où elles subiront une succession de changements moléculaires qui les amèneront à arrêter de proliférer et à entamer un processus de différenciation spécifique. Cette transition se produit durant le processus de migration des cellules le long de la crypte; ainsi elles sont pleinement différenciées lorsqu'elles atteignent la jonction entre la crypte et la villosité. Conséquemment, l'épithélium villositaire est composé de cellules différenciées et fonctionnelles qui continueront leur migration jusqu'à l'apex de la villosité où elles seront finalement expulsées dans la lumière intestinale (Marieb, 1999).

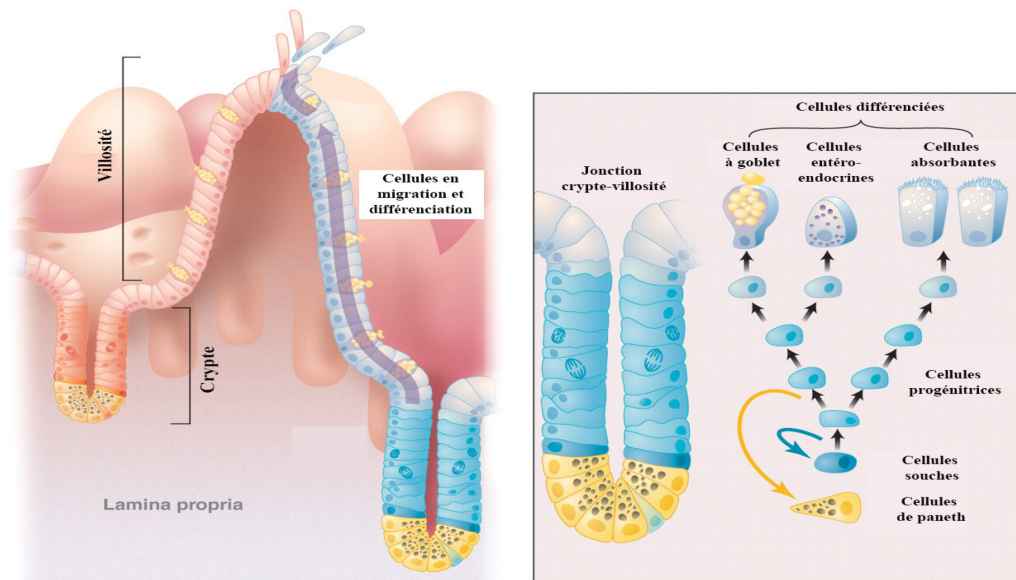


Figure 2 - L'axe crypte-villosité de l'intestin grêle et l'axe cryptal du colon

Gauche : Dans l'intestin grêle, les villosités forment des projections vers la lumière intestinale et sont constituées de cellules épithéliales différenciées et non prolifératives. À l'autre extrémité, l'on retrouve les cellules de Paneth et les cellules souches qui sont localisées tout au fond des cryptes. Les cellules souches se divisent et vont donner naissance aux cellules progénitrices qui vont proliférer et migrer de façon ascendante le long de l'axe cryptal (à l'exception des cellules de Paneth). **Droite :** Durant le processus de migration, les cellules vont entamer un programme de différenciation permettant de donner les quatre types cellulaires qui composent l'épithélium intestinal : les cellules absorbantes (entérocytes) et les cellules caliciformes, les cellules de Paneth et les cellules entéroendocrines.

Tiré et modifié de Radtke et Clevers, 2005; License # 3397170588167

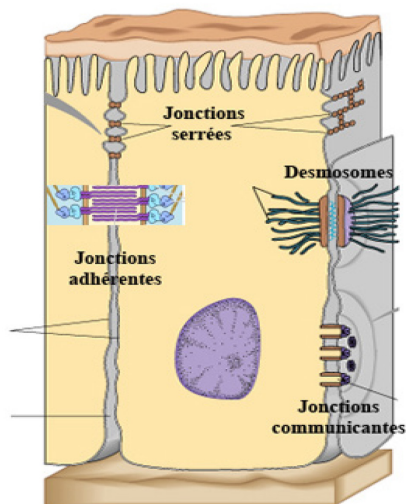
Les cellules souches de l'épithélium intestinal peuvent engendrer deux grandes catégories de cellules différenciées : les cellules absorbantes (entérocytes) et les cellules de la lignée sécrétrice (cellules caliciformes, cellules de Paneth et cellules entéroendocrines). Les cellules absorbantes, communément appelées entérocytes, sont de loin le type cellulaire le plus abondant et représentent près de 90% des cellules de l'épithélium intestinal. L'entérocyte mature possède un large réseau de microvillosités à sa surface apicale et ce dernier est impliqué dans la fragmentation terminale des di-peptides, di-saccharides et des protéines présentes dans la lumière intestinale. On retrouve une multitude d'enzymes associées à cette bordure en brosse, notamment la sucrase-isomaltase (SI), la lactase-phlorizine hydrolase (LPH), la phosphatase alcaline (AP) et la dipeptidyl-peptidase IV (DPPIV). Ainsi, l'entérocyte contribue directement à la digestion des nutriments via l'expression de ces enzymes et assure l'absorption ainsi que le transport des nutriments du côté basolatéral, permettant ainsi leur relargage dans la circulation sanguine. Les cellules caliciformes, aussi appelées cellules à goblet, sont responsables de la sécrétion du mucus et du relâchement dans la lumière intestinale de peptides tels que TFF3, impliqués dans la protection et le maintien de la barrière épithéliale intestinale (Kim et Ho, 2010). Ces cellules permettent de lubrifier et de protéger l'épithélium contre l'abrasion mécanique occasionnée par le déplacement du bol alimentaire et contre l'invasion de l'épithélium par les bactéries présentes dans la lumière intestinale. Les cellules à goblet sont caractérisées par un cytoplasme apical distendu ainsi que par l'accumulation de granules de sécrétion. Les cellules entéroendocrines font partie de la catégorie de cellules sécrétrices et représentent moins de 1% des cellules qui composent l'épithélium intestinal. Ces dernières sont spécialisées dans la sécrétion d'une panoplie de peptides gastro-intestinaux essentiels à la régulation de la satiété, de la motilité du tube digestif, de la digestion et de l'absorption des nutriments. Finalement, les cellules de Paneth qui participent à la protection de l'épithélium intestinal par la sécrétion de peptides anti-microbiens tels que les défensines (Porter et al., 2002). Elles se différencient des autres types de cellules matures de l'épithélium, en premier lieu par leur migration descendante durant le processus de différenciation, par la localisation des cellules pleinement différenciées au fond des cryptes, de même que par leur durée de vie beaucoup plus longue (20 jours) que les autres types cellulaires (Porter et al., 2002).

Le côlon diffère quelque peu de l'intestin grêle, tant au niveau de sa structure qu'au niveau de sa fonction (Marieb, 1999). Contrairement à l'intestin grêle, l'épithélium colique ne possède pas de villosités et est composé uniquement d'un épithélium simple prismatique et de cryptes. On y retrouve principalement des cellules absorbantes qui assurent l'assimilation de l'eau et des nutriments, les cellules à goblet qui produisent du mucus de même que les cellules entéroendocrines qui sécrètent des hormones ou peptides gastro-intestinaux. Contrairement à l'intestin grêle, le côlon ne possède pas de cellules de Paneth, ce qui s'explique par le fait que le côlon abrite une quantité impressionnante de micro-organismes, cette flore participe activement à l'homéostasie du tube digestif. D'ailleurs, cette dernière permet la digestion terminale des fibres présentes dans le côlon et produit plusieurs déchets qui sont à leur tour utilisés comme nutriments par les colonocytes tels que l'acétate, le propionate et le butyrate (Velazquez et al., 1997).

1.2 La barrière épithéliale et l'expression des protéines de jonction

En plus des fonctions de digestion et d'absorption, l'épithélium intestinal agit comme barrière physique en protégeant le tissu contre les insultes de l'environnement (Madara, 1998). Ainsi, les cellules formant l'épithélium intestinal s'assemblent en une couche imperméable grâce à la présence des jonctions cellulaires. Chaque cellule épithéliale intestinale (CEIs) est reliée à sa voisine par trois types de jonctions cellulaires: les jonctions serrées (TJ), les jonctions adhérentes (AJ) et les desmosomes (Figure 3). Les AJ et les desmosomes sont importants pour maintenir le lien physique entre deux cellules, alors que les TJ forment une structure continue autour des cellules qui scelle l'espace intercellulaire et qui régule le transport paracellulaire (Groschwitz et Hogan, 2009).

Les complexes de jonctions sont formés par des protéines transmembranaires qui interagissent de façon homotypique au niveau de leur domaine extracellulaire afin de relier les cellules entre elles. Les domaines intracellulaires de ces protéines s'ancrent au cytosquelette via des effecteurs cytoplasmiques. Pour ce qui est des TJ, les protéines transmembranaires qui les composent sont principalement les occludines et claudines qui interagissent directement avec les protéines cytoplasmiques de la famille des zonula



Protéines de jonctions intercellulaires

- | |
|---|
| <ol style="list-style-type: none"> 1. ZO-1 2. Claudines 3. Occludines 4. E-cadhérine 5. Caténines 6. Actine |
|---|

Figure 3 - Complexes de jonction des cellules épithéliales intestinales

Les cellules épithéliales forment des contacts intercellulaires qui sont organisés sous forme de plateforme d'adhérence. La jonction serrée se situe du côté apical et contrôle la perméabilité paracellulaire. Les jonctions adhérentes et les desmosomes sont des contacts intercellulaires qui permettent le maintien de la cohésion entre les cellules épithéliales tandis que les jonctions communicantes permettent le passage d'ions et de petites molécules entre cellules adjacentes. Les principales protéines composant les jonctions intercellulaires sont énumérées dans la table de droite.

Tiré et modifié de *www.bio.miami.edu*

occludens: ZO-1, ZO-2 et ZO-3 (Mitic et al., 2000); ces dernières s'associent avec les filaments d'actine au niveau intracellulaire. Ainsi, les TJ ceinturent les CEIs et permettent de sceller l'espace intercellulaire, de restreindre la diffusion paracellulaire et de stabiliser la monocouche épithéliale (Madara, 1998). Les TJ délimitent également la portion apicale de la membrane basolatérale et, en conjonction avec les protéines des complexes de jonctions adhérentes, permettront l'établissement d'une polarisation cellulaire typique des CEIs (Chiba et al., 2008). De leur côté, les AJ permettent le maintien de l'intégrité de la monocouche et donnent de la rigidité à l'épithélium grâce à l'attachement mécanique des cellules entre elles.

L'assemblage de ces jonctions à la surface cellulaire est induit par des interactions homophiliques dépendantes du calcium entre les domaines extracellulaires des cadhérines,

notamment la E-cadhérine dans les CEIs. La E-cadhérine s'associe au niveau intracellulaire avec les caténines (α , β et γ), notamment la α -caténine qui permet l'interaction de ce complexe d'adhésion avec le cytosquelette d'actine. La α -caténine est la seule caténine capable de lier directement les filaments d'actine pour réguler l'adhésion, mais est aussi capable de recruter d'autres protéines telles que la vinculine, VASP et Mena qui sont impliquées dans la promotion de la polymérisation de l'actine (Vasioukhin et Fuchs, 2001).

Ce complexe multiprotéique agit donc comme point d'ancrage des AJ, tout en assurant aussi la régulation du cytosquelette qui lui est associé. La suppression de la E-cadhérine, par répression transcriptionnelle ou par ARN interférence, cause une dissociation de la monocouche épithéliale (Behrens et al., 1985; Comijn et al., 2001), tandis qu'à l'inverse son expression ectopique dans les fibroblastes résulte à la formation d'agrégats cellulaires similaires à ceux formés par les cellules épithéliales (Nagafuchi et al., 1987). L'engagement de la E-cadhérine au sein des complexes de jonction permet aussi de réguler divers processus cellulaires, notamment en contrôlant l'activité de plusieurs voies de signalisation. Par exemple, les jonctions dépendantes de la E-cadhérine régulent l'activation du sentier de signalisation PI3K/AKT qui est impliqué dans la différenciation morphologique et fonctionnelle des CEIs (Laprise et al., 2002). Également, la E-cadhérine lie et séquestre la β -caténine au sein du complexe d'adhésion, ce qui permet de contrôler sa localisation et par conséquent, son activité transcriptionnelle. Ainsi, la β -caténine non liée à la E-cadhérine peut interagir avec son partenaire nucléaire TCF4 pour former un complexe transcriptionnel impliqué dans le contrôle de la prolifération des CEIs (Solanas et al., 2008).

2 Renouveaulement de l'épithélium intestinal et contrôle de la prolifération cryptale.

2.1 Le cycle cellulaire

L'épithélium intestinal est un tissu à renouvellement rapide qui est assuré par une population de cellules souches pluripotentes localisées au fond des cryptes. Ces dernières résident dans un compartiment cellulaire nommé niche, où se regroupent les cellules souches épithéliales, les cellules de Paneth (Tan et Barker., 2014), des cellules mésenchymateuses ainsi qu'un ensemble de facteurs de croissance, d'éléments de la matrice

extracellulaire et de cytokines (King et Dekaney, 2013). Ce microenvironnement protège les cellules souches contre les stimuli d'apoptose et de différenciation, en plus de favoriser leur prolifération (Moore et Lemischka, 2006). Une fine régulation des processus de prolifération et différenciation des cellules souches et progénitrices de la crypte intestinale est nécessaire pour assurer l'homéostasie du tissu. Le contrôle de la prolifération cryptale intestinale est assuré par des signaux mitogéniques, induits par des facteurs de croissance (EGF, TGF β , divers FGF, IGF-1, HGF, PDGF, Hh, Wnts, BMPs) qui sont sécrétés tant par les CEIs que par les cellules du mésenchyme adjacent. Ces facteurs de croissance activent des voies de signalisation impliquées dans la progression du cycle cellulaire. Ce dernier est divisé en quatre phases distinctes, contrôlées par l'activation séquentielle des complexes protéiques cyclines/Cdks. Suite à un stimulus mitogénique, la cellule va entamer la phase G1 du cycle, phase pendant laquelle on observe une augmentation importante de la synthèse protéique. À la fin de la phase G1, la cellule passe un point de restriction qui l'engage de façon irréversible dans le cycle cellulaire et ce, indépendamment de la présence des facteurs mitogéniques. Les facteurs de transcription de la famille des E2Fs contrôlent cette transition G1/S en permettant l'expression d'enzymes impliquées dans la réplication de l'ADN telles que DHFR, TK et la polymérase α (La Thangue, 1994). La cellule entre alors en phase S et réplique son ADN permettant d'augmenter le contenu génétique. Ensuite la cellule entre en phase G2, phase pendant laquelle elle s'assure de la réplication intégrale et adéquate de l'ADN en plus de débiter la condensation des chromosomes. Ceci permettra de préparer à la mitose (phase M) où la cellule se divise en deux cellules-filles, terminant ainsi un cycle cellulaire.

La régulation du cycle cellulaire est contrôlée par une famille de protéines kinases dépendantes des cyclines, les Cdks. Ces kinases sont actives seulement lorsqu'elles sont associées avec leurs cyclines correspondantes et l'expression de ces dernières varie en fonction des différentes phases du cycle cellulaire. Les Cdks représentent ainsi les sous-unités catalytiques, tandis que les cyclines sont les sous-unités régulatrices (Morgan, 1997). La phase G1 est sous le contrôle du complexe cycline D-Cdk4/6 tandis que la transition G1/S est assurée surtout par le complexe cycline E-Cdk2. Les complexes cycline D-Cdk4/6 et cycline E-Cdk2 hyperphosphorylent la protéine p105Rb (Lundberg et Weinberg, 1998;

Connell-Crowley et al., 1997) dont la fonction principale est de séquestrer les facteurs de transcription E2Fs. Ainsi, l'hyperphosphorylation des protéines pRb induit un changement conformationnel qui permet la relâche et l'activation des E2Fs libérant leur potentiel transcriptionnel. De son côté, le complexe cycline A-Cdk2 contrôle le déroulement de la phase S et intervient aussi au niveau de la phase G2. Finalement, le complexe cycline B-Cdk1 régule la transition G2/M et l'entrée en mitose.

Des régulateurs négatifs du cycle cellulaire peuvent contrecarrer l'activité des complexes cyclines-Cdks et sont regroupés sous deux familles en fonction de leurs mécanismes d'action et des complexes cycline-Cdk cibles (Figure 4). Le premier groupe est caractérisé par sa capacité à inhiber l'assemblage du complexe cycline D-Cdk4/6, ce qui empêche ainsi l'activation prématurée des Cdk4 en absence de facteurs mitotiques et peut induire un arrêt du cycle l'activation cellulaire en phase G1 (Sherr et Roberts, 1999). Ce groupe est nommé

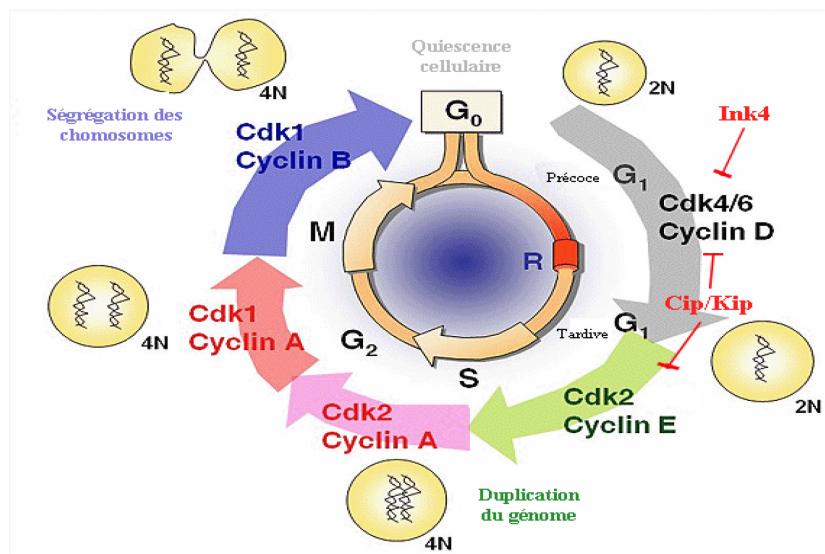


Figure 4 - Régulation du cycle cellulaire par les complexes Cyclines/Cdk

Le cycle cellulaire est divisé en quatre phases distinctes : la phase G₁ qui est celle du doublement du contenu protéique, la phase S qui est la phase de réplication de l'ADN, la phase G₂ qui est la phase de préparation à la mitose, la phase M qui est la mitose et dont la finalité est la division de la cellule en deux cellules-filles. L'activation successive des complexes cycline/Cdk permet la progression ordonnée du cycle cellulaire; certains de ces complexes kinasiques sont requis pour la réplication de l'ADN (phase S) tandis que d'autres sont nécessaires à la ségrégation des chromosomes durant la mitose (phase M).

Tiré et modifié de pics8.this-pic.com

INK4 (Inhibitor of Cdk4) et est composé de quatre membres : p15^{INK4B}, p16^{INK4A}, p18^{INK4C} et p19^{INK4D}. Malgré des fonctions très similaires, chaque membre semble répondre à des signaux anti-prolifératifs distincts. Par exemple, l'expression de p16^{INK4A} est principalement impliquée à la sénescence associée au vieillissement cellulaire ainsi qu'en réponse à un stress oncogénique (Rayess et al., 2012). De son côté, l'expression de p15^{INK4B} est fortement induite par la signalisation du TGFβ, un facteur anti-prolifératif pour les cellules épithéliales normales (Reynisdottir et al., 1995; Peterson et al., 1996). Les autres membres p18^{INK4C} et p19^{INK4D}, bien que moins bien caractérisés, peuvent être également induits en réponse à des stress oncogéniques (Zindy et al., 1998) et semblent jouer un rôle de suppresseur de tumeurs dans différents modèles murins (Fåhraeus et al., 1998).

Le deuxième groupe d'inhibiteurs des complexes cyclines-Cdks est la famille des inhibiteurs KIP/CIP (p21^{Cip1}, p27^{Kip1} et p57^{Kip2}) qui réprime l'activité kinase de la plupart des Cdks (Denicourt et Dowdy, 2004). Ces protéines nucléaires agissent par l'intermédiaire d'un domaine N-terminal relativement conservé. Ce domaine contient des régions de liaisons aux cyclines et aux Cdks, permettant à ces inhibiteurs de lier un grand nombre de complexes cyclines-Cdks. La fixation de p27 ou de p21 sur une Cdk entraîne des changements de conformation du domaine catalytique de la Cdk et bloque ainsi l'accès de l'ATP au site catalytique (Takebayashi et al., 2000). De son côté, la protéine p21 n'exerce un effet inhibiteur que lorsque son niveau protéique est supérieur à celui des complexes cyclines-Cdks, à l'inverse les complexes ne possédant qu'une seule molécule p21 sont actifs (Zhang et al., 1994; Sherr et Roberts, 1995). Cet effet paradoxal de p21 entre inhibition et coopération serait dû à sa stœchiométrie. En effet, p21 favorisent l'assemblage du complexe cycline D1-Cdk4/6 en empêchant la dégradation de la cycline D1 (Bartek et Lukas, 2001) pendant la progression de la phase G1 (Takebayashi et al., 2000). Ainsi, cette coopération entre p21 et la cycline D1 représente un mécanisme général d'activation de Cdk4 pendant la progression du cycle cellulaire (phase G1). De plus, il a été proposé que les membres de la famille KIP/CIP agissent comme assembleurs des complexes cycline D1-Cdk4 favorisant leur translocation nucléaire. En effet, il a été montré que la surexpression de la cycline D1 dans des cellules quiescentes n'était pas suffisante à l'activation de Cdk4, suggérant l'intervention d'autres facteurs tels que p21. Ces notions sont supportées par des

études effectuées sur les modèles de souris invalidés pour p21 et p27 qui ont démontré que ces deux protéines sont indispensables à l'activation de Cdk4 (Sherr et Roberts, 1999; 2004). Par contre, des études plus récentes ont démontré que les MEFs isolés de ces souris maintiennent une faible activité CDK4 modulable par les facteurs mitogéniques (Bagui et al., 2000; Sugimoto et al., 2002), suggérant que ces facteurs participent à la régulation de l'activité de CDK4, mais ne sont pas absolument essentiels.

Dans de nombreuses situations pathologiques, la dérégulation des mécanismes de contrôle du cycle cellulaire est largement observée : perte de fonction des inhibiteurs endogènes tels que p16 et p27, surexpression de la cycline D1 et de Cdk4, altération des substrats des Cdks comme pRb. Ainsi, la perte d'expression par mutation, méthylation ou dégradation des inhibiteurs du cycle cellulaire comme p16^{CIP} et p27^{Kip1} promeut la croissance des cellules tumorales (Yew, 2001). Il est intéressant de noter que l'étude de souris doublement inactivées pour différents gènes des inhibiteurs des Cdks (p18⁻/p21⁻ et p18⁻/p27⁻) a apporté la preuve de la collaboration fonctionnelle de ces inhibiteurs (Franklin et al., 2000).

2.2 Les voies de signalisation impliquées dans le contrôle de la prolifération normale des cellules épithéliales intestinales

L'épithélium intestinal est un tissu en constant renouvellement et la régulation spatio-temporelle des processus de prolifération, de différenciation, de migration et d'apoptose permet le maintien de l'homéostasie de cet épithélium complexe. Ce renouvellement est régulé par des voies de signalisation qui coopèrent pour maintenir une balance entre prolifération, différenciation et survie cellulaire. Une meilleure connaissance des mécanismes moléculaires qui régulent la prolifération des CEIs dans la crypte est nécessaire à la compréhension des différentes pathologies associées à l'épithélium, notamment le cancer colorectal. Le contrôle de la prolifération des cellules de l'épithélium intestinal est assuré par plusieurs voies de signalisation, dont les plus importantes sont les voies Wnt/ β -caténine, Ras/Raf/MEK/ERK, Notch, BMPs, PI3K/Akt et Hedgehog. Elles sont responsables de la régulation d'une multitude d'effecteurs impliqués directement ou indirectement dans le contrôle du cycle cellulaire.

2.2.1 La voie de signalisation Wnt/ β -caténine

La voie Wnt/ β -caténine joue un rôle crucial dans le maintien et la prolifération des cellules souches et progénitrices de l'épithélium intestinal (Clevers, 2006). L'activation de cette voie de signalisation est assurée par les facteurs Wnts, des glycoprotéines riches en cystéines qui agissent comme ligands extracellulaires (Figure 5).

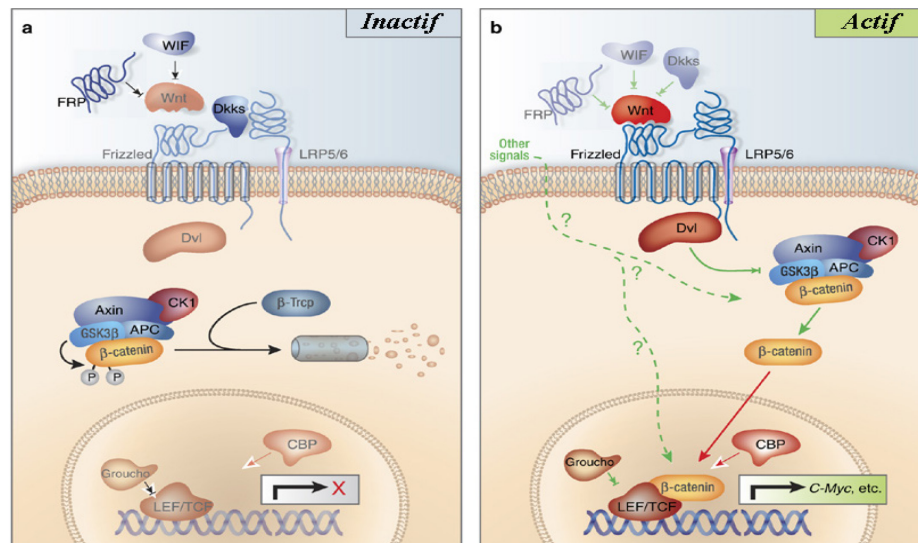


Figure 5 – La voie de signalisation Wnt/ β -caténine

A) En absence du facteur Wnt, les protéines APC, Axine et Dvl forment un complexe et s'associent avec les kinases GSK3 β et CK1 α , qui phosphorylent alors la β -caténine et entraîne sa dégradation par le protéasome. **B)** En présence de facteur Wnt, il y a activation de Frizzled et de son co-récepteur LRP5/6, induisant ainsi un désassemblage du complexe de dégradation. La β -caténine est libérée et s'accumule dans le cytoplasme, pour s'accumuler ensuite dans le compartiment nucléaire, s'associer avec son partenaire transcriptionnel TCF4 et activer la transcription de leurs gènes cibles.

Tiré et modifié de Luo et al., 2007; License #3397171086507

Actuellement, il existe 19 gènes *WNTs* identifiés chez l'humain (Miller, 2002) et ils agissent sur les CEIs soit de façon paracrine lorsqu'ils sont sécrétés par les cellules du mésenchyme ou de façon autocrine lorsque sécrétés par les cellules de l'épithélium. Les facteurs Wnts permettent l'activation de divers sentiers de signalisation via leur liaison à des récepteurs à sept domaines transmembranaires de la famille Frizzled (Fz). Au niveau intestinal, la voie canonique est stimulée surtout par les facteurs Wnt3, Wnt6 et Wnt9b qui lient leurs récepteurs Fz (Fz4, Fz6 ou Fz7) (Gregorieff et al., 2005) et co-récepteurs apparentés aux

récepteurs des LDL, soient LRP5 et LRP6 (LDL-Related Protein). L'activation par les facteurs Wnts régularise l'assemblage d'un complexe multiprotéique impliqué dans la régulation de la stabilité de la β -caténine cytoplasmique et non liée aux jonctions adhérentes. En absence de facteurs Wnts, la β -caténine cytoplasmique est liée à un complexe multiprotéique, nommé complexe de dégradation, qui est composé du suppresseur de tumeur APC, de l'Axine, de la CK1 α et de la GSK3 β (Orford et al., 1997). L'Axine est en fait composée de deux isoformes sensiblement identiques au niveau fonctionnel, soit l'Axine 1 et l'Axine 2 (Chia et Costantini, 2005). Ces protéines d'échafaudage jouent un rôle central dans l'assemblage de ce complexe et permettent aux kinases CK1 α et GSK3 β de phosphoryler la β -caténine sur plusieurs résidus sérines et thréonines (respectivement : Ser-45 et Ser-33, Ser-37, Thr-41). Ces phosphorylations induiront sa liaison à l'ubiquitine E3 ligase nommée β -TrCP, ce qui mènera à sa dégradation subséquente par le protéasome. La liaison des facteurs Wnts du côté extracellulaire permet donc le recrutement de LRP5/6 et Fz entraînant l'hyperphosphorylation du côté intracellulaire de la protéine Dishevelled (Dvl). À son tour, Dvl interagit directement avec les protéines Axine 1/2 via son domaine DIX et stimule son recrutement au niveau de LRP5/6, de même que des protéines associées au complexe de dégradation de la β -caténine. Les kinases GSK3 β et CK1 α induisent alors la phosphorylation des motifs PPPSPxS des co-récepteurs LRP5/6. Ces motifs sont retrouvés dans leur queue cytoplasmique (Metcalfé et Bienz, 2011; He et al., 2004) et leurs phosphorylations permettent aux protéines LRP5/6 de lier le site catalytique de GSK3 β en agissant comme pseudo-substrat (Metcalfé and Bienz, 2011). Ce qui bloque la phosphorylation de la β -caténine par GSK3 β et permet son accumulation dans le cytoplasme et de façon subséquente dans le noyau. La forme nucléaire de β -caténine s'associera alors avec les facteurs TCF/LEF, notamment TCF4 dans les CEIs (van Es et al., 2012), pour former un complexe transcriptionnel fonctionnel capable de lier l'ADN et d'induire l'expression des gènes cibles. Étant donné que la β -caténine ne possède pas de séquence de localisation nucléaire, elle transloque vers le noyau en s'associant aux membres de la famille TCF-LEF via son domaine ARD (Behrens et al, 1996; Huber et al., 1996). Cependant, cette translocation a également été démontrée comme pouvant être indépendante des facteurs TCF-LEF (Fagotto et al., 1998). Le domaine de liaison à l'ADN du facteur TCF4 permet au complexe β -caténine/TCF4 de lier ses gènes

cibles, alors que les domaines d'activation transcriptionnelle sont apportés par la β -caténine (Gregorieff et Clevers, 2005).

L'activation de cette voie est étroitement contrôlée par d'autres facteurs que les Wnts, notamment par un inhibiteur extracellulaire du récepteur Fz nommé Dickkopf (Dkk). Ce dernier interagit à la fois avec les co-récepteurs LRP5/6 ainsi qu'avec une protéine appelée Kremen pour empêcher la dimérisation de LRP5/6 et de Fz induite par les Wnts (Mao et al., 2001; Bafico et al., 2001). Il existe également d'autres voies de signalisation activées par les Wnts et qui agissent indépendamment de la β -caténine (Scoville et al., 2008). Ces voies dites non-canoniques sont les voies Wnt/ Ca^{++} et Wnt/PCP qui sont impliquées dans l'activation de la PKC, de CamKII et de petite GTPase Rho et Rac (Ishida-Takagishi et al., 2012). De manière intéressante, la voie Wnt/ β -caténine est plus active au fond des cryptes et contrôle la prolifération cellulaire (Clevers, 2006), alors que la voie Wnt/ Ca^{++} est plus active en haut des cryptes ainsi qu'à la surface de l'épithélium et intervient plutôt dans la différenciation cellulaire (Veeman et al, 2003).

Au niveau nucléaire, le complexe β -caténine/TCF4 régule l'expression d'une multitude de gènes fortement impliqués dans la prolifération cellulaire tels que c-myc (He et al., 1998) et la cycline D1 (Tetsu et McCormick, 1999). Par l'expression de c-myc, la voie Wnt/ β -caténine réprime aussi l'expression de $p21^{CIP1}$, levant ainsi son effet inhibiteur sur la progression du cycle cellulaire (van de Wetering et al., 2002). Plusieurs études ont mis en évidence le rôle essentiel de la voie canonique des Wnts dans la prolifération et le renouvellement des cellules de l'épithélium intestinal (Clevers, 2006). Par exemple, chez la souris, la perte de fonction du facteur de transcription TCF4 (Korinek et al., 1998) ainsi que l'inactivation conditionnelle de la β -caténine (Ireland et al., 2004; Fevr et al., 2007) conduisent à une perte des cryptes ainsi qu'à la disparition du compartiment prolifératif dans l'intestin. De la même façon, l'expression ectopique de Dkk-1 dans l'épithélium intestinal murin bloque l'activation de Frizzled par les Wnts et induit la perte des cryptes intestinales (Pinto et al., 2003; Kuhnert et al., 2004).

2.2.2 La voie de signalisation des MAP kinases ERK1/ERK2

Les MAPK (mitogen-activated protein kinase) sont organisées en modules de signalisation hautement conservés qui permettent à la cellule de réagir rapidement à son environnement en régularisant une multitude de fonctions cellulaires telles que la prolifération, la migration, la différenciation ainsi que la survie cellulaire (Yoon et Seger, 2006). La force et la durée de l'activation de ces kinases déterminent l'issue physiologique sur la cellule, ces réponses varient selon le type cellulaire, la nature des agonistes et des récepteurs qui déclenchent le signal de même que les composantes de la cascade impliquées dans la transmission du signal à l'intérieur de la cellule. Chaque module de signalisation MAPK comporte trois kinases (MAP3K, MAP2K et MAPK) qui s'activent de façon séquentielle par phosphorylation. Chez les mammifères, on retrouve sept groupes distincts de MAP kinases : ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinases), ERK3/4, ERK5, ERK7/8, JNK1/2/3 (Jun N-terminal kinases), les isoformes p38 (p38 $\alpha/\beta/\delta/\gamma$) et NLK (Cargnello et Roux, 2011). Elles sont activées par des MAP2Ks spécifiques, par exemple : MEK1/2 activent ERK1/2, MEK5 active ERK5, MKK3/6 activent p38, MKK4/7 activent les JNKs, MEK5 active ERK5. Les kinases activatrices de ERK3/4, ERK7/8 et NLK n'ont pas encore été identifiées (Figure 6).

Les MAPK sont des sérines/thréonines kinases qui possèdent un motif Thr-X-Tyr conservé dans la boucle d'activation du sous-domaine kinase et l'identité du X dans ce motif détermine l'appartenance à une de ces familles. Ainsi le motif Thr-Gly-Tyr est associé aux kinases p38, Thr-Glu-Tyr est associé aux kinases ERK et Thr-Pro-Tyr est associé aux kinases JNK (Songyang et al., 1996; Cowan et al., 2003). Les MAP3K peuvent activer plus d'une MAP2K, ce qui augmente la diversité et la complexité de ces cascades de signalisation et permet à chaque MAP3K de conférer une réponse distincte à différents stimuli. De plus, il existe différentes isoformes pour chacun des membres qui composent la cascade, rendant ainsi ces voies de signalisation encore plus complexes. Par exemple, l'activation d'ERK1/2 par des facteurs de croissance mitogéniques dépend de l'activation des MAP3K RAF-1, BRAF et/ou CRAF et des MAP2K MEK1 et MEK2.

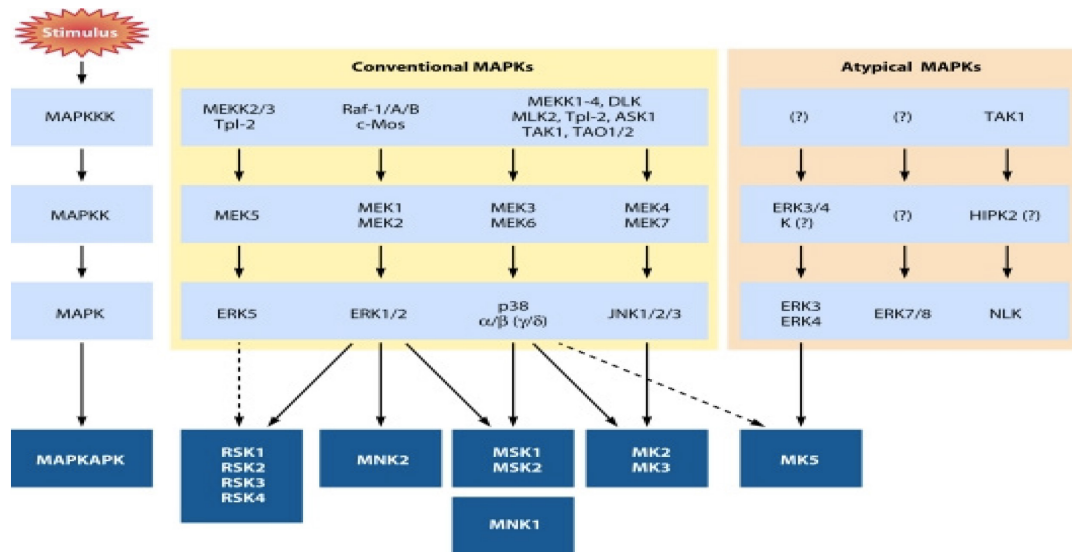


Figure 6- Les voies de signalisation des MAP kinases

Chez les mammifères, on retrouve sept groupes distincts de MAPK : les kinases ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinases), ERK3/4, ERK5, ERK7/8, JNK1/2/3 (Jun N-terminal kinases), les isoformes p38 (p38 $\alpha/\beta/\delta/\gamma$) et NLK. Chaque module de signalisation MAP Kinase comporte trois kinases (MAP3K, MAP2K et MAPK) qui s'activent de façon séquentielle par phosphorylation afin de réagir rapidement à son environnement en régularisant une multitude de fonctions cellulaires telles que la prolifération, la migration, la différenciation ainsi que la survie cellulaire.

Tirée et modifié de Cargnello et Roux, 2011; Autorisation account # 3000795014

Les cascades de phosphorylation des MAPK sont favorisées par la formation de complexes de protéines d'échafaudage. Plusieurs facteurs tels que MEK partner 1 (MP1), la Paxiline, la Arrestine, KSR, 14-3-3, JIP, JSAP1 participent la signalisation des MAPK en liant les MAPKKK, les MAPKK et les MAPK (Dhanasekaran et al., 2007). Les protéines d'échafaudage favorisent les interactions entre les différents membres des complexes de signalisation, mais participent également à leur translocation vers les différents compartiments cellulaires (Mor et Philips, 2006). Elles participent aussi à la spécificité de la signalisation cellulaire en favorisant la transduction du signal au niveau des protéines auxquelles elles peuvent s'associer (Kolch, 2005). De plus, la phosphorylation de ces protéines peut moduler leur affinité pour les protéines associées et moduler la spécificité, l'amplitude ou la durée du signal (Bogoyevitch et Kobe, 2006).

Les Kinases ERK1/2 sont activées par des facteurs de croissance mitogéniques, incluant le PDGF, l'EGF, le NGF et l'insuline. Elles sont également activées par des ligands de récepteurs couplés aux protéines G hétérotrimériques (GPCRs), des cytokines, des stress osmotiques et par la désorganisation des microtubules (Boulton et al., 1990). En réponse à l'EGF, son récepteur (EGFR) devient phosphorylé sur résidus tyrosine, ce qui permet l'ancrage de protéines adaptatrices telles que GRB2 qui contiennent un domaine SH2 capable de lier les phosphotyrosines du récepteur activé. GRB2 provoquera alors le recrutement de SOS, un facteur d'échange de nucléotide. Ce dernier permet aux membres de la famille RAS (HRAS, NRAS et KRAS) d'échanger leur GDP pour un GTP, les rendant ainsi actifs. RAS-GTP active alors la kinase MAP3K (RAF), qui à son tour active MAP2K (MEK1/2) par phosphorylation sur les sérines 217 et 221 (Ohren et al., 2004). La régulation de RAS et RAF sont cruciales pour le maintien de la prolifération cellulaire des CEIs et les mutations activatrices de ces gènes sont connues pour leur implication dans la tumorigénèse colorectale (Karnoub et Weinberg, 2008). Les membres de la famille RAF démontrent des propriétés différentes quant à leur capacité de phosphoryler et d'activer les kinases MEK1 et MEK2. En effet, BRAF est le plus actif suivi par RAF-1 et A-RAF (Pritchard et al., 1995; Marais et al., 1997). Ces conclusions sont supportées par des études effectuées sur les modèles murins invalidés pour ces kinases qui démontrent que BRAF est le membre le plus important impliqué dans l'activation de la cascade MEK/ERK (Huser et al., 2001; Mikula et al., 2001; Mercer et al., 2002). L'activation de BRAF requière son association avec la forme active de RAS ou Rap1, de même que la phosphorylation des ses résidus Thr⁵⁹⁸ et Ser⁶⁰¹ (Zhang et Guan, 2000 et 2001). Ces phosphorylations sont localisées dans la boucle d'activation du domaine catalytique de BRAF et contribuent directement à l'augmentation de son activité face à ses substrats (Wan et al., 2004). BRAF possède également un domaine d'auto inhibition, ce dernier est sensible à la phosphorylation sur Ser⁴⁴⁵ qui permet de bloquer l'effet inhibiteur de ce domaine (Tran et al., 2005).

Les protéines MEK1 et 2 sont des kinases à double spécificité qui phosphorylent les ERK1/2 sur Thr²⁰² et Tyr²⁰⁴ menant à leur activation (Charest et al., 1993). La phosphorylation des kinases ERK1 et ERK2 cause un changement de conformation et une

augmentation de leur activité spécifique (Seger et Krebs, 1995). Sous formes inactives, les kinases ERK1/2 sont retenues au niveau du cytoplasme en association avec les protéines MEK1/2 qui possèdent une séquence d'exportation nucléaire (Bardwell et Thorner, 1996). Suite à leur activation, les kinases ERK1 et ERK2 sont phosphorylées, se dissocient des protéines MEKs et peuvent ainsi phosphoryler une multitude de protéines cytoplasmiques telles que MLCK (Klemke et al., 1997) et MNK1 (Waskiewicz et al., 1997) ainsi que des protéines membranaires comme le récepteur de l'EGF (Gan et al., 2010). Elles peuvent également transloquer au noyau où elles phosphorylent des cibles nucléaires, en grande partie des facteurs de transcription impliqués dans la régulation de l'expression génique. À ce jour, les protéines ERK1/2 sont les seuls substrats connus de l'activité kinase de MEK1/2 (Pearson et al., 2001; Frémin et Meloche, 2010). De manière intéressante, il a été démontré que MEK1 peut induire l'export nucléaire de protéines autres que ERK1/2 et ce, indépendamment de son activité kinase. Ceci a été démontré pour le récepteur nucléaire PPAR γ , où l'export nucléaire suite à une stimulation mitogénique participe à sa pleine inactivation (Burgermeister et al., 2007). Perry et collaborateurs ont également rapporté que MEK1/2 se localisent au noyau des cellules musculaires où elles s'associent directement au facteur de transcription MyoD pour réprimer son activité (Perry et al., 2001).

Bien que la famille des ERKs comporte huit membres (ERK 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 et 8), ce sont principalement les kinases ERK1 et ERK2 qui ont été les plus largement étudiées. Ceci s'explique par le fait qu'elles ont été les premières identifiées et qu'elles ont démontré un rôle important dans la prolifération cellulaire (Pagès et al., 1993; Bogoyevitch et Court, 2004; Yoon et Seger, 2006). Les protéines ERK1 et ERK2 sont des sérines/thréonines kinases qui partagent les mêmes substrats. Jusqu'à présent, près de 150 cibles ont été identifiées (Yoon et Seger 2006; http://www.kinasource.co.uk/Database/E_substrates/Erk_substrates.html). En plus de détenir un site consensus de phosphorylation par ERK1/2 (P-X-S/T-P), les substrats possèdent la plupart du temps un site d'ancrage appelé le domaine CD (Common Docking). Jusqu'à présent, la plupart des substrats identifiés sont surtout des facteurs de transcription impliqués dans le contrôle de la prolifération cellulaire, notamment ELK-1, c-ETS-1, c-ETS-2, c-fos et c-myc (Treisman, 1996). ERK1 et ERK2 peuvent également phosphoryler les kinases RSK (Zhao et al., 1996), MNK1/2 et MSK1/2 (Roux et

Blenis, 2004) ainsi que des facteurs impliqués dans la survie cellulaire tels que Bad (Hayakawa et al., 2000), BCL2 (Tamura et al., 2004) et BIM (Harada et al., 2004). Une analyse protéomique des substrats de ERK2 a récemment identifié 80 nouvelles cibles jusqu'alors inconnues et qui sont associées à différents processus cellulaires, incluant la transcription, la traduction, la maturation des ARNm ainsi que la régulation de l'activité de petites GTPases de la famille de Rho (Carlson et al., 2011). À quelques exceptions près, l'activation des kinases ERK1/2 se traduit généralement par une augmentation de la prolifération cellulaire et une protection contre l'apoptose (Yoon et Seger 2006). Cette réponse cellulaire est néanmoins influencée par la durée d'activation des ERK1/2 et peut être interprétée différemment dépendamment du type cellulaire. Ainsi, une activation soutenue de ERK1/2 permet l'entrée dans le cycle cellulaire des fibroblastes (Meloche et al., 1992), alors que dans les cellules PC12, elle induit leur différenciation (Marshall, 1995).

La régulation de la voie de signalisation des MAP kinases ERK1/2 est déterminante pour définir la réponse physiologique appropriée. Son activation dépend de plusieurs facteurs qui influencent son activité spatio-temporelle, notamment la densité, la désensibilisation et l'internalisation des récepteurs membranaires, les protéines d'échafaudage qui permettent l'interaction des MAPK avec divers partenaires, leur localisation subcellulaire ainsi que le maintien de l'équilibre entre les MAPK activées et les phosphatases qui éteignent leur activité (Caunt et Keyse, 2012). Plusieurs familles de phosphatases déphosphorylent et inactivent ERK1 et ERK2. La double phosphorylation sur résidus tyrosine et thréonine est essentielle à leur activité et la déphosphorylation de l'un ou l'autre de ces résidus est suffisante pour inhiber l'activité kinasique. Il existe trois types de phosphatases capables d'inactiver ERK1 et ERK2: des sérine/thréonine phosphatases, des tyrosine phosphatases et des phosphatases à double spécificité (Keyse, 2000). L'inactivation des kinases ERK1/2 est principalement réalisée par la famille des phosphatases à double spécificité DUSP (Dual Specificity Phosphatases) appelées aussi MKP (MAP Kinase Phosphatases), qui ciblent les résidus phosphotyrosine et phosphothréonine (Patterson et al., 2009). En fonction de leur localisation subcellulaire, on distingue à ce jour trois classes de DUSP: les DUSP de la classe I (DUSP 1- 5) qui sont des phosphatases nucléaires inductibles, les DUSP de la

classe II (DUSP 6, 7, 9) qui sont principalement cytosoliques et les DUSP de classe III (DUSP 8, 10, 16) qui sont nucléaires et cytosoliques. Ces enzymes possèdent une spécificité de substrats pour les différentes familles de MAPK, incluant évidemment ERK1 et ERK2 (Bermudez et al., 2010). Par ailleurs, certaines DUSP sont induites par des facteurs de transcription eux-mêmes activés par les MAPK, suggérant ainsi la présence de mécanismes de rétrocontrôle négatif qui participent à la régulation de l'activité des MAPK en fonction du temps (Owens et Keyse, 2007; Ebisuya et al., 2005).

Certaines études effectuées par notre groupe de recherche ont démontré l'importance et la nécessité de l'activité ERK1/2 dans le contrôle de la prolifération des CEIs. Tout d'abord, en utilisant un anticorps reconnaissant les formes phosphorylées et actives de ERK1/2, notre groupe a démontré que celles-ci étaient principalement détectées dans le noyau des cellules cryptales de l'épithélium intestinal fœtal humain (Aliaga et al., 1999). De plus, le facteur de croissance EGF, un mitogène pour les cellules épithéliales intestinales (Baliga et al., 1989), induit une activation soutenue des kinases ERK1/2 qui corrèle avec l'entrée en phase S du cycle cellulaire des CEIs (Aliaga et al., 1999; Rivard et al., 1999). Plus spécifiquement, l'activation des ERK1/2 permet l'induction de la cycline D1 (Boucher et al., 2004) ainsi que l'expression de c-myc (Lee et al., 2010), deux facteurs clés impliqués dans la progression du cycle cellulaire. De plus, dans les CEIs l'activation des kinases ERK1/2 est requise pour diminuer les niveaux protéiques de p27^{KIP1} (Rivard et al., 1999), un inhibiteur des complexes cyclines-Cdks impliqué dans la quiescence et l'arrêt du cycle cellulaire (Coats et al., 1996; Rivard et al., 1996). L'activité ERK1/2 stimule en outre la synthèse protéique et permet la translocation nucléaire du facteur de transcription E2F4, nécessaire à l'expression d'enzymes impliquées dans la réplication de l'ADN (Deschênes et al. 2004; Garneau et al., 2009; Paquin et al., 2013). Dans l'ensemble, ces études et d'autres (Rhoads et al., 1997; Dionne et al., 1998; Sheng et al., 2006) démontrent que l'activité ERK1/2 promeut la prolifération des CEIs en contrôlant plusieurs facteurs clés impliqués dans la transition G1/S du cycle cellulaire.

2.2.3 La voie de signalisation PI3K/Akt

Une autre voie de signalisation importante pour le contrôle de la prolifération cryptale

intestinale est la voie de la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), une lipide kinase qui phosphoryle et transforme les phosphatidylinositols (4,5)-bisphosphates (PIP₂) en phosphatidylinositols (3,4,5)-trisphosphates (PIP₃) (Figure 7).

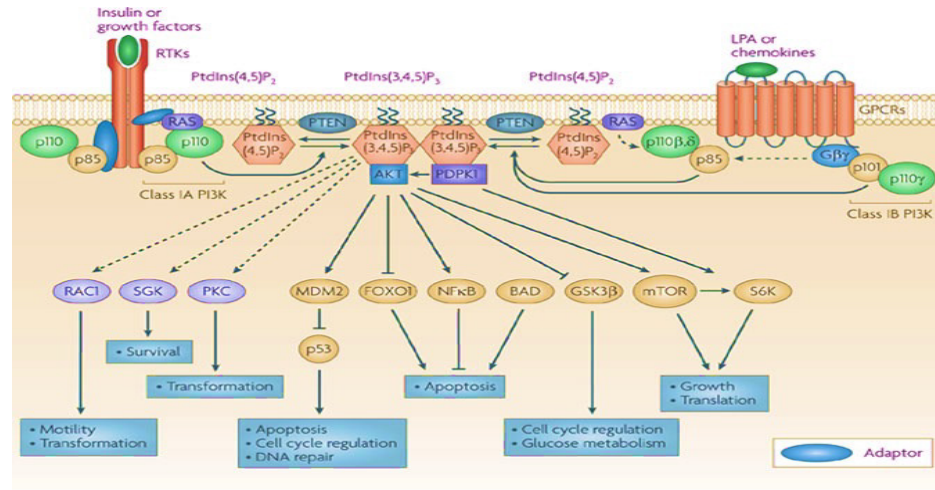


Figure 7- La voie de signalisation PI3K/Akt

La voie PI3K/Akt est activée, entre autres, par des facteurs de croissance. Ces derniers vont entraîner l'activation d'un récepteur tyrosine kinase ou d'un récepteur couplé aux protéines G qui, à son tour entraîne directement l'activation de la PI3K ou indirectement via le recrutement de protéines adaptatrices. Une fois activée, la PI3K catalyse la transformation du PIP₂ en PIP₃, permettant le recrutement d'Akt et PDK1 à la membrane plasmique où Akt est activé par des phosphorylations de PDK1 et mTORC2. Akt phosphoryle alors plusieurs substrats impliqués dans une multitude de processus cellulaires. Cette voie est inactivée par les phosphatases d'Akt (PHLPP) de même que par la phosphatase PTEN qui transforme le PIP₃ et PIP₂.

Tiré et modifié de Liu et al., 2009; Autorisation #3397210517833

L'accumulation de PIP₃ dans le feuillet interne de la membrane cytoplasmique forme des sites de liaison menant au recrutement de protéines possédant un domaine PH telles que les kinases PDK1 et Akt/PKB. Il en résulte la phosphorylation et l'activation d'Akt par PDK1, puis Akt phosphoryle à son tour plusieurs protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire, de la traduction, du métabolisme, de la survie cellulaire ainsi que dans la réorganisation du cytosquelette (Cantley, 2002). La signalisation PI3K/Akt peut être activée directement par la protéine RAS (Rodriguez et al., 1997) qui agit en aval des récepteurs à activité tyrosine kinase. Dans les CEIs en culture, l'activation de la signalisation PI3K/Akt

est nécessaire à la synthèse d'ADN induite par l'EGF ou le TGF β ainsi qu'à l'induction de la cycline D1 impliquée dans la transition G1/S (Sheng et al., 2003). Le traitement des CEIs avec le LY294002 (inhibiteur de la PI3K) ou la rapamycine (inhibiteur de mTOR, un effecteur important de la PI3K) réduit la prolifération des CEIs en culture en induisant un arrêt du cycle en phase G₁ (Shao et al., 2004). De plus, il a été démontré que l'activation de la signalisation PI3K/Akt joue un rôle important dans la transformation cellulaire et est essentielle à la réorganisation du cytosquelette induite par la forme oncogénique de HRAS (Rodriguez et al., 1997). Chez la souris, l'activation de la PI3K serait impliquée dans l'hyperprolifération de l'épithélium suite à l'infection par *Citrobacter rodentium* (Brown et al., 2011) ainsi qu'à la surexpression du récepteur TLR4 (Santaolalla et al., 2013). Plus récemment, il a été rapporté que les souris exprimant une forme constitutive active de la sous-unité p110 de la PI3K développent une hyperplasie épithéliale et une néoplasie intestinale (Leystra et al., 2012).

3 La différenciation entérocytaire

L'épithélium intestinal est un tissu en constant renouvellement et la régulation spatio-temporelle des processus de prolifération, différenciation et migration permet le maintien de cet épithélium complexe. Les cellules souches sont situées au fond des cryptes et donnent naissance aux cellules-filles qui migrent vers le haut de la crypte tout en entamant un processus de différenciation. Au niveau du tiers inférieur de la crypte se retrouvent les cellules progénitrices qui perdent progressivement leur capacité de prolifération et acquièrent graduellement les caractéristiques de cellules différenciées essentielles à l'accomplissement des fonctions spécialisées du tissu. Dans la partie supérieure de la crypte, les CEIs sont pleinement différenciées et ont procédé à un arrêt complet et définitif de leur prolifération cellulaire (Pinto et Clevers, 2005). Plusieurs mécanismes moléculaires sont impliqués dans cet arrêt de prolifération qui est essentiel à l'induction subséquente de leur différenciation (Sancho et al., 2003). Cette capacité intrinsèque de différenciation des cellules progénitrices provient de leur communication avec l'environnement (mésenchyme, facteurs de croissance présents dans lumière intestinale) ainsi qu'à la régulation de l'expression génique modulée par l'activité des facteurs de transcription. L'exemple le mieux documenté concerne le programme de différenciation des cellules entérocytaires qui

est contrôlé par l'action combinée des facteurs de transcription Cdx2, HNF1 α et Gata-4, lesquels synergisent pour permettre la pleine expression des gènes spécifiques de l'intestin et nécessaires à l'induction et au maintien de la différenciation entérocytaire (Lussier et al., 2008; Walters, 2005; Boudreau et al., 2002; Gao et al., 2009).

3.1 Rôle du facteur de transcription Cdx2 dans la différenciation entérocytaire

Le facteur de transcription Cdx2 fait partie d'une famille des protéines à homéodomaine associées au gène *Caudal* chez la drosophile. Ce dernier est exprimé tôt au cours de l'embryogenèse et permet de définir les structures postérieures nécessaires au développement de l'embryon (Beck et al., 1995). Chez l'adulte, son expression est restreinte à l'épithélium de l'intestin grêle et du côlon où il régule l'expression de protéines d'adhésion, de transporteurs ainsi que de gènes spécifiques à l'intestin (James et al. 1991; Suh et al., 1994). Chez la souris, l'invalidation de *Cdx2* entraîne une mort embryonnaire au jour 3,5 p.c, tandis que la délétion homozygote conditionnelle chez l'adulte entraîne un arrêt de la différenciation des CEIs (Goa et al., 2009; 2010). De manière intéressante, l'expression ectopique de Cdx2 régule de façon négative la prolifération des CEIs normales et cancéreuses, en plus d'induire l'apparition d'un phénotype d'entérocyte mature dans plusieurs modèles cellulaires (Guo et al., 2004). La surexpression de Cdx2 dans la lignée cryptale intestinale IEC-6, qui n'exprime pas ce facteur de transcription de façon endogène, est à elle seule capable d'induire un certain niveau de différenciation entérocytaire associée à l'apparition d'une morphologie cylindrique, d'une polarisation cellulaire, à l'établissement de jonctions serrées, à la formation de structures multicellulaires ainsi qu'à la présence de microvillosités à la surface apicale de ces cellules (Suh et al., 1994; Suh et Traber, 1996). Des analyses par micropuces d'ADN montrent l'induction de gènes impliqués dans la digestion des sucres tels que la *sucre-isomaltase* (Suh et Traber, 1996) et la *lactase-phlorizin hydrolase* (Fang et al., 2000), ainsi que des gènes impliqués dans les interactions cellule-cellule et cellule-matrice tels que *LI-cadhérine*, *E-cadhérine*, β 4*intégrine*, α -*actinine* ainsi que *claudine-2* (Keller et al., 2004). Finalement, l'expression ectopique de Cdx2 dans l'épithélium gastrique induit la formation de métaplasie intestinale supportant aussi un rôle très important de ce facteur de transcription dans la détermination des cellules épithéliales intestinales (Silberg et al., 2002).

Certaines voies de signalisation contrôlent l'activité de Cdx2 et par conséquent la différenciation des CEIs. La régulation de l'activité de Cdx2 par phosphorylation a déjà fait l'objet d'études dans notre groupe de recherche. Dans les CEIs prolifératives, la kinase Cdk2 induit la phosphorylation de Cdx2, ciblant ainsi ce dernier à la dégradation par le protéasome, ce qui réduit son activité transcriptionnelle (Boulanger et al., 2005; Gross et al., 2005). À l'inverse au cours du processus de différenciation, l'activité PI3K promeut l'assemblage des AJ, contrôlant ainsi l'activité de MAP kinase p38 α (Laprise et al., 2002). Cette dernière phosphoryle aussi Cdx2 sur un autre résidu, augmentant ainsi sa capacité de transactivation et par conséquent l'expression de marqueurs de différenciation entérocytaire (Houde et al., 2001).

3.2 Régulation de la voie RAS/RAF/MEK/ERK lors de la différenciation entérocytaire

Les mécanismes moléculaires qui contrôlent le changement du statut prolifératif vers un statut différencié sont encore mal compris. La différenciation terminale des CEIs est associée à un arrêt du cycle cellulaire (Sancho et al., 2003), corrélant ainsi avec l'inhibition de la voie de signalisation RAS/RAF/MEK/ERK (Aliaga et al., 1999; Laprise et al., 2004; Taupin et Podoslky 1999; Ding et al., 2001). En effet, des études réalisées dans le laboratoire de la P^{re} Rivard ont démontré que les formes actives et phosphorylées de ERK1/2 sont principalement retrouvées au noyau des cellules indifférenciées et prolifératives de la crypte intestinale fœtale humaine (Aliaga *et al.*, 1999). Au niveau des cellules différenciées de la villosité, on retrouve une faible activité ERK1/2 qui est principalement localisée au niveau du cytoplasme. On retrouve le même parallèle en culture, en effet on observe dans les cellules Caco-2/15 sous-confluentes un fort niveau d'activité ERK1/2 nécessaire à leur prolifération cellulaire (Aliaga et al., 1999; Rivard et al., 1999; Rhoads et al., 1997; Jasleen et al., 2000; Chiu et al., 2002). Suite à l'atteinte de la confluence, les cellules Caco-2/15 entament un processus de différenciation entérocytaire associé à une forte réduction du niveau d'activation des kinases ERK1/2. Cette diminution d'activité pourrait être attribuable à l'expression de DUSP-1 et DUSP-6, deux MAP kinases phosphatases capables de déphosphoryler les ERK1/2 et dont l'expression est augmentée dès l'initiation de la différenciation entérocytaire (Aliaga et al., 1999). De plus, l'activité de

RAS, en amont des ERK1/2, diminue progressivement suite à l'atteinte de la confluence, ce qui peut également contribuer à l'inactivation des kinases ERK1/2 (Aliaga et al., 1999; Celano et al., 1993). De façon concomitante, l'engagement de la E-cadhérine suite à l'atteinte de la confluence induit aussi une diminution de la signalisation MEK/ERK et ce, de façon PI3K/Akt dépendante (Laprise et al., 2004). En somme, plusieurs mécanismes semblent coexister pour diminuer l'activité des ERK1/2 lors de la différenciation des CEIs (Taupin et Podoslky, 1999; Ding et al., 2001; Celano et al., 1993; Baron-Delage et al., 1996), mais le rôle exact et la nécessité de cette inactivation dans l'arrêt de prolifération et dans l'induction de la différenciation reste à clarifier. Collectivement, ces évidences démontrent que l'activité du sentier MEK/ERK est finement régulée durant le processus de différenciation entérocytaire suggérant que l'inhibition de cette signalisation pourrait être nécessaire à l'initiation du processus de différenciation entérocytaire.

4 Les cancers du côlon

4.1 Statistiques et épidémiologie du cancer colorectal

Le cancer colorectal (CRC) est le second cancer en importance occupant également la seconde place au niveau des causes de mortalité associées au cancer en Amérique du Nord. Cette année, on estime que 23 000 Canadiens (13 000 hommes et 10 300 femmes) recevront un diagnostic de cancer colorectal et 9 200 (5 000 hommes et 4 200 femmes) en mourront (ACCC, Association Canadien du Cancer Colorectal, 2013). Dans l'ensemble, le taux de cancer du côlon et du rectum est plus élevé chez l'homme que chez la femme. Les raisons ne sont pas tout à fait claires, mais les recherches portent à croire qu'il peut y avoir un lien avec l'alimentation, la masse corporelle, l'activité physique, les hormones ainsi que les antécédents familiaux (Statistique Canada, 2013).

Les formes héréditaires des cancers colorectaux (transmission mendélienne) représentent une faible proportion de ceux-ci, soit entre 5-10% des cas. On retrouve trois principaux syndromes de prédisposition aux cancers du côlon soient la polypose adénomateuse familiale (FAP), le syndrome de polypose juvénile (JPS) et le cancer colorectal héréditaire sans polypose (HNPCC). Le FAP est associé à une mutation inactivatrice du gène suppresseur de tumeur *APC* (*adenomatous polyposis coli*). Pour les JPS, certaines mutations

dans le gène *SMAD4* (Howe et al., 1998) et *BMPRIA* (Howe et al., 2001) ont été mises en évidence. Dans le cas des HNPCC, on retrouve une perte de fonction des gènes encodant pour des protéines impliquées dans la réparation de l'ADN telles que MLH1 et MSH2 (Lynch, 1998). De plus, les maladies inflammatoires intestinales comme la colite ulcéreuse ou la maladie de Crohn peuvent aussi être responsables du développement du cancer du côlon, mais ne représentent que 2% des cas (Weitz et al., 2005). Le cancer sporadique est la forme prédominante du cancer colorectal représentant entre 88-94% des cas. Cette dernière est généralement issue d'un adénome et est associée à une mutation perte de fonction du suppresseur de tumeur *APC* (dans 70%-80% des cas) (Fearon et Vogelstein, 1990; Jass, 2007). Même si cette mutation est d'origine sporadique, il n'en reste pas moins qu'un antécédent familial est retrouvé dans près d'un cinquième des cas (Weitz et al., 2005). Ceci suggère qu'il pourrait y avoir également une prédisposition génétique à développer un cancer colorectal d'origine sporadique. Cette hypothèse est supportée par le fait que le risque de développer la maladie est augmenté lorsqu'un membre de la famille a déjà souffert de ce type de cancer (Statistique Canada, 2013).

4.2 Propriétés cellulaires menant au développement du cancer colorectal

Du point de vue cellulaire, le cancer se définit comme une pathologie induite par une suite d'altérations génétiques de cellules somatiques qui entraînent des modifications physiologiques de celles-ci. Ceci conduit à la formation de cellules cancéreuses dont l'une des principales caractéristiques est de proliférer de façon incontrôlée. Ces altérations génétiques vont avoir pour conséquence de modifier la physiologie des cellules par étapes successives et non en une seule fois. En adéquation avec cette idée, Hanahan et Weinberg ont proposé que la formation d'une tumeur nécessite l'acquisition de dix propriétés cellulaires communes à la plupart, voire à la totalité des tumeurs (Figure 8) : 1- *Autosuffisance en signaux de croissance* : la tumeur produit elle-même des signaux de croissance afin de ne pas dépendre totalement de son microenvironnement. 2- *Insensibilité aux signaux inhibant la croissance* : les cellules tumorales doivent échapper à ces signaux qui bloquent le cycle cellulaire. 3- *Évasion du système immunitaire* : Comprends l'ensemble des mécanismes d'échappement immunitaire engagés par la cellule tumorale pour assurer sa survie. Le système immunitaire entretient un état d'équilibre dynamique

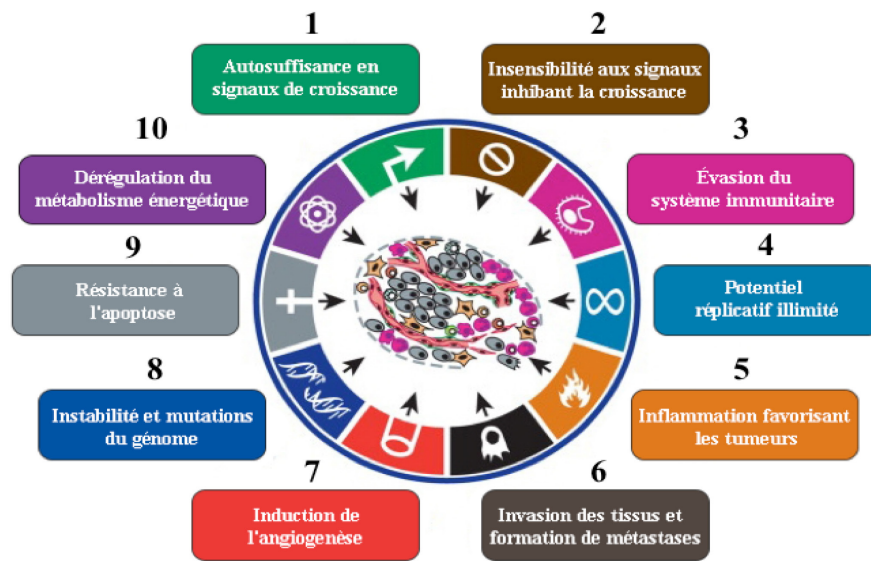


Figure 8 - Propriétés cellulaires menant au développement du cancer

Résumé des 10 phénotypes typiquement observés chez les cellules cancéreuses leur permettant de survivre et de former des métastases.

Tiré et modifié de Hanahan et Weinberg, 2011; Autorisation #3397171255203

prévenant l'évolution du cancer; lorsque cet équilibre est brisé, le cancer peut de nouveau continuer sa progression. 4- *Potentiel répliatif illimité* : les cellules tumorales limitent l'érosion des télomères qui progresse normalement au fur et à mesure des cycles de division, permettant ainsi d'échapper aux mécanismes de sénescence. 5- *Inflammation favorisant les tumeurs* : l'inflammation contribue à augmenter la présence de molécules bioactives dans le microenvironnement tumoral incluant les facteurs de croissance qui induisent des signaux de prolifération soutenus ou limitent la mort cellulaire, des facteurs pro-angiogéniques, des enzymes impliquées dans le remodelage de la matrice extracellulaire qui facilitent l'angiogenèse, l'invasion et la formation de métastases en plus d'induire des signaux menant à l'activation de l'EMT. 6- *Invasion des tissus et métastases* : durant le développement de la plupart des tumeurs, les cellules vont se détacher de la tumeur et être à l'origine de la formation de tumeurs dans d'autres organes. 7- *Induction de l'angiogenèse* : lorsque la tumeur devient volumineuse, elle doit être capable d'initier la formation de nouveaux vaisseaux sanguins pour assurer un apport en oxygène et en nutriments. 8- *Instabilité et mutation du génome* : Le bon fonctionnement des mécanismes

de détection des dommages à l'ADN, de la réparation de ces dommages et de la progression du cycle cellulaire empêchent la formation et la propagation d'altérations génétiques. En cas de dysfonctionnement, des mutations ponctuelles et des réarrangements chromosomiques peuvent mener à l'instabilité génomique qui conduit à l'accumulation de mutations menant à l'activation d'oncogènes ou à l'inactivation de suppresseurs de tumeurs. 9- *Résistance à l'apoptose* : parallèlement à l'augmentation de la prolifération, l'inhibition de la mort cellulaire programmée contribue également à l'expansion d'une population de cellules cancéreuses et favorise l'accumulation d'altérations génétiques. 10- *Dérégulation du métabolisme énergétique* : Des altérations du métabolisme du glucose, appelées effet Warburg, permettent de soutenir la prolifération incontrôlée des cellules cancéreuses. Ces ajustements consistent principalement à limiter l'ensemble du métabolisme énergétique à la glycolyse menant à un état nommé « glycolyse aérobie » (Hanahan et Weinberg, 2000; 2011).

4.2.1 Implication de l'instabilité génomique et de la méthylation de l'ADN dans la carcinogénèse colorectale.

Une multitude d'altérations génétiques et épigénétiques ont été rapportées pour leurs implications dans la carcinogénèse colorectale, notamment au niveau de l'instabilité des chromosomes, de la méthylation de l'ADN, de l'amplification génique ainsi que l'apparition de mutations dans des gènes codant pour des oncogènes ou des suppresseurs de tumeurs. Dans les cas des cancers colorectaux, il existe principalement deux types d'instabilité génomique: l'instabilité chromosomique (CIN) et l'instabilité des microsatellites (MSI) (Worthley et al., 2007). Les CIN représentent la majorité des cas de cancers du côlon avec 70-85% des cas, tandis que les MSI se retrouvent dans 20% des cas. Les formes héréditaires HNPCC de cancers du côlon ont mis en évidence le lien entre ce type de cancer et les mutations des gènes de réparation de l'ADN : *MSH2* et *MLH1* (Fu et al., 2008). Conséquemment, on retrouvera l'accumulation progressive de mutations dans les séquences génomiques, notamment dans les séquences des microsatellites, d'où le nom de MSI.

En plus de l'instabilité génomique, on retrouve fréquemment dans les cancers du côlon des

modifications épigénétiques associées à des anomalies de méthylation de l'ADN. Certaines tumeurs du côlon présentent des hyperméthylations des cytosines ainsi que des dinucléotides CpG, notamment dans les îlots CpG riches situés dans les régions régulatrices des gènes. Ces méthylations modifient l'expression génique et sont impliquées dans le développement de tumeurs appelées CIMP pour *CpG Island methylator phenotype* (Toyota et al., 1999). Selon les études, 24 à 50% des cancers sporadiques du côlon sont CIMP positif (Worthley et al., 2007). Fait intéressant, il a été démontré que la majorité des cancers sporadiques du côlon MSI+ sont associés à des méthylations du promoteur du gène *MLH1* (Weisenberger et al., 2006). Ainsi une méthylation aberrante est donc également favorable à l'apparition de nouvelles mutations qui participeront à la progression du cancer du côlon.

4.2.2 La séquence adénome-carcinome dans les cancers du côlon.

Le cancer colorectal résulte de l'accumulation progressive d'altérations génétiques et épigénétiques qui vont permettre l'initiation puis la progression du processus tumoral. L'étude des formes héréditaires de cancers du côlon a permis de mieux comprendre les mécanismes responsables du développement des cancers colorectaux sporadiques. C'est entre autres le cas des mutations du gène *APC*, qui ont été mises évidence chez les patients souffrant du syndrome FAP. Maintenant, il a été démontré que les mutations perte de fonction du suppresseur de tumeur *APC* est l'évènement moléculaire le plus fréquent de la tumorigénèse colorectale et qu'*APC* est retrouvé muté dans une majorité des cas de cancers sporadiques (Nagase et Nakamura, 1993). Le produit de ce gène est impliqué dans la régulation de la voie de signalisation Wnt/ β -caténine et participe aux processus de migration cellulaire et de ségrégation de chromosomes (Aoki et Taketo, 2007). Il est intéressant de noter que les tumeurs ne présentant pas de mutation dans le gène *APC* possèdent fréquemment des mutations dans d'autres régulateurs de la voie Wnt tels que dans les gènes encodant pour la β -caténine ou l'Axine 2 (Liu *et al.*, 2000 ; Morin *et al.*, 1997). Cette altération génétique n'est pas la seule à être impliquée; parmi les plus courantes, on retrouve des mutations ponctuelles aux oncogènes *KRAS*, *BRAF* et *PI3K* ainsi qu'aux gènes suppresseurs de tumeurs *p53* et *DCC* (Fearon et Vogelstein, 1990; Simon et al, 1994; Kinzler et Vogelstein, 1996; Nishimura, 2008). Le nombre de mutations nécessaires au développement d'un cancer reste inconnu, mais d'après certaines estimations, il serait au

minimum de trois (Loeb, 1991). Bien que très simplifié, le modèle de carcinogénèse proposé par Vogelstein a été le premier à rallier modifications génétiques et phénotype, en plus d'illustrer la nécessité d'accumuler un certain nombre de mutations pour permettre la progression tumorale (Fearon et Vogelstein, 1990; Figure 9).

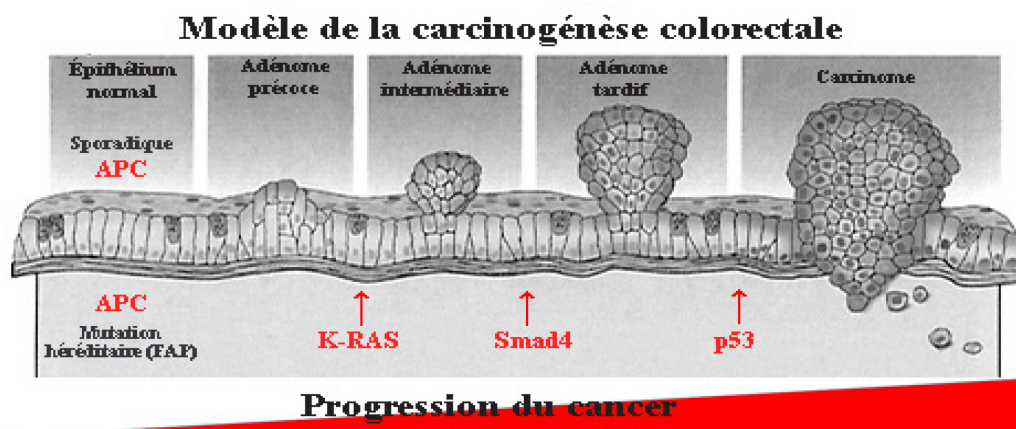


Figure 9 - Modèle de la carcinogénèse colorectale

Modèle de progression de la carcinogénèse colorectale proposé par Fearon et Vogelstein. Ce modèle a été le premier à rallier modifications génétiques et phénotypes, en plus d'illustrer la nécessité d'accumuler un certain nombre d'altérations génétiques pour la progression tumorale (Fearon et Vogelstein, 1990).

Tiré et modifié de *rockefeller.edu*

Le cancer du côlon est issu des cellules de l'épithélium intestinal et son développement progressif (par grades ou stades) est associé à une succession d'événements génétiques et épigénétiques. Dans un premier temps, il y aura formation de foyers de cryptes aberrantes qui évolueront en adénomes, ces derniers pourront progresser dans la tumorigénèse et former des carcinomes. Ces différentes étapes, visibles d'un point de vue anatomique, sont associées à l'accumulation de mutations au niveau des gènes *APC*, *KRAS*, *SMAD4* et *p53*. L'ordre d'apparition de ces mutations est fonction de la fréquence de ces mutations dans les différents stades de la tumorigénèse. Par exemple, la mutation perte de fonction de *p53* est retrouvée dans 11-13% des adénomes précoces, 47% des adénomes tardifs et 74% des carcinomes (Vogelstein *et al.*, 1988). Ceci n'exclut pas que dans certaines tumeurs, cette mutation puisse survenir avant ou après ce stade. Ainsi, l'ordre dans lequel ces mutations apparaissent n'est donc pas le même pour toutes les tumeurs, de même que toutes ces mutations ne sont pas forcément retrouvées dans une même tumeur (Smith *et al.*, 2002).

Ainsi, le modèle de carcinogénèse proposé par Vogelstein n'illustre pas la complexité de ces altérations génétiques, de même qu'il ne prend pas en compte leurs interrelations ainsi que la contribution des autres voies de signalisation également impliquées dans la tumorigénèse colorectale.

Plusieurs questions persistent sur l'origine des cellules capables de propager la tumeur après son initiation. Deux modèles de carcinogénèse sont proposés, le modèle stochastique et celui issu des cellules souches cancéreuses (CSC). Selon le modèle stochastique, chaque cellule qui compose la population tumorale a la capacité d'initier la formation de tumeurs distantes. Quant au modèle CSC, il propose que seulement une fraction des cellules qui composent la tumeur possèdent la capacité de promouvoir le potentiel tumoral, ces dernières sont nommées cellules souches cancéreuses (CSCs). Plusieurs voies de signalisation seraient impliquées dans le développement de ce type de cancer, notamment la voie Wnt et Notch, de même que l'interaction entre les CRCs et leur microenvironnement (Vaiopoulos et al., 2012). Les CSCs sont caractérisées par un rythme prolifératif limité, une grande capacité d'autorenouvellement, un caractère multipotent ainsi que par leur capacité à échapper au système immunitaire. Les CSCs sont hautement résistantes aux thérapies classiques utilisées dans le traitement du cancer, notamment grâce à leur capacité à exprimer une multitude d'enzymes impliquées dans la réparation de l'ADN, dans la désintoxication et/ou le transport de drogues. L'implication des CSCs dans la carcinogénèse colorectale est longtemps restée controversée, dû principalement à l'absence de marqueurs moléculaires permettant de les identifier. Plusieurs marqueurs des CSCs ont été découverts au fil des années tels que CD133, CD44, CD24, CD166, Lgr-5, et ALDH-1 pour ne nommer que ceux-ci (Vaiopoulos et al., 2012). L'un des premiers marqueurs des CSCs issus du cancer colorectal à avoir été identifié est la glycoprotéine transmembranaire CD133 qui est impliquée dans l'organisation de la membrane plasmique. Des essais de xénogreffes effectués sur des cellules tumorales triées ont démontré que les cellules CD133 positives sont capables d'initier la croissance tumorale, contrairement aux cellules CD133 négatives (O'Brien et al., 2007; Ricci-Vitiani et al., 2007). L'expression de CD133 est également observée à un faible niveau dans le colon normal, suggérant qu'il existe une potentielle relation entre les cellules souches normales et cancéreuses. Ces hypothèses soulèvent

plusieurs questions concernant l'efficacité des mesures de diagnostic et de traitement du cancer colorectal et mettent en perspective l'intérêt de cibler les CSCs plutôt que l'ensemble des cellules qui composent la tumeur.

4.2.3 La transition épithélio-mésenchymateuse

La transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) est un processus biologique associé à un changement phénotypique d'une morphologie épithéliale à une morphologie fibroblastique. L'EMT est normalement activée lors de l'embryogenèse (Kong et al., 2011) ainsi que dans les épithéliums lors de la réparation de blessure (Kalluri et Weinberg, 2009). Cette transition se traduit par la perte des caractéristiques épithéliales au profit de l'expression de marqueurs mésenchymateux (Greenburg et al., 1982). L'EMT est aussi activée de façon anormale durant des processus pathologiques, notamment au cours de la progression du cancer. Les cellules cancéreuses d'origine épithéliale utiliseront souvent l'EMT pour acquérir de nouvelles propriétés biochimiques et des caractéristiques morphologiques leur permettant de s'échapper de la tumeur primaire. Par la suite, ces cellules pourront migrer jusqu'aux vaisseaux sanguins, entrer dans la circulation, s'établir dans un site distant et former des foyers métastatiques (Figure 10).

La migration cellulaire constitue le point de départ du processus métastatique et est nécessaire à l'invasion tumorale ainsi qu'à la colonisation d'organes et tissus distants (Kalluri et Weinberg, 2009). Pour être invasive, la cellule cancéreuse doit changer sa morphologie et moduler ses interactions avec les structures qui l'entourent, tout particulièrement avec les composantes de la matrice extracellulaire qui constituent la première barrière à franchir. L'EMT induit chez les CEIs une perte des caractéristiques épithéliales (forme cuboïdale, polarité apico-basale, expression des cytokératines) au profit de l'adoption de caractéristiques propres aux cellules mésenchymateuses (expression de α SMA, N-cadhérine, élongation de la forme cellulaire, augmentation de la migration). Ainsi, la baisse de l'expression des marqueurs épithéliaux ainsi que l'augmentation des marqueurs mésenchymateux sont les principaux marqueurs moléculaires de l'EMT (Table 1 – *Marqueurs moléculaires de l'EMT*). Un des déterminants majeurs est la réduction de l'adhésion intercellulaire et la perte de la protéine de jonction adhérente E-cadhérine. Cette

dernière contrôle l'adhésion cellule-cellule et sa perte perturbe fortement l'architecture épithéliale (Guarino et al., 2007; Peinado et al., 2004). Un certain nombre de régulateurs négatifs de l'expression de la E-cadhérine sont connus, parmi ceux-ci on retrouve les facteurs de transcription à doigts de zinc Snail1 et Snail2. Ces derniers sont de forts répresseurs transcriptionnels de la E-cadhérine capables d'induire l'EMT dans plusieurs modèles de cellules épithéliales (Guarino et al., 2007; Schmalhofer et al., 2009). Notamment, Snail1 qui est retrouvé surexprimé dans les cellules tumorales localisées au front invasif et serait responsable de la perte des contacts cellulaires régulés par la E-cadhérine, favorisant ainsi l'invasion subséquente de ces cellules (Peinado et al., 2004).

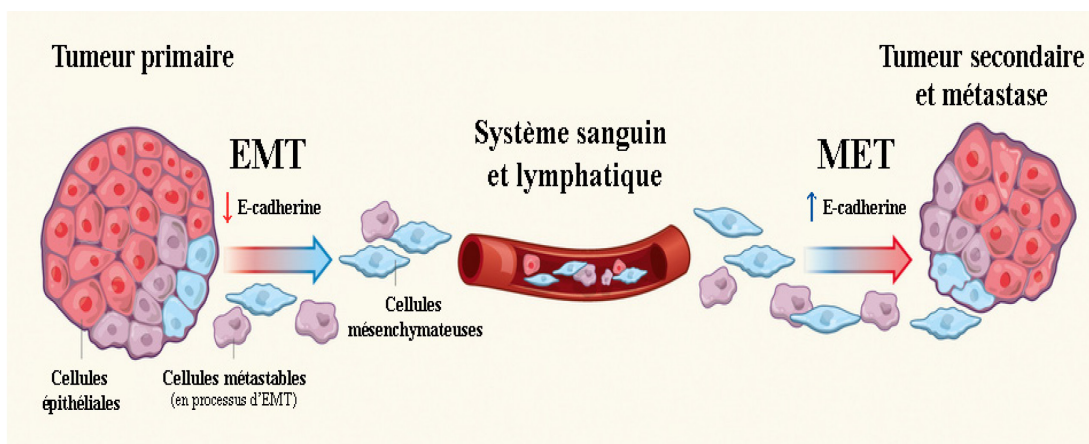


Figure 10- Implication de l'EMT dans l'invasion et la formation de métastases

Rôle de la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) dans la progression du cancer. L'EMT est associée à un changement phénotypique d'une morphologie épithéliale à une morphologie de cellules mésenchymateuses. Les cellules cancéreuses d'origine épithéliale utiliseront souvent l'EMT pour acquérir de nouvelles propriétés biochimiques et des caractéristiques morphologiques leur permettant de s'échapper de la tumeur primaire. Notamment, la perte de la protéine E-cadhérine localisée dans les jonctions adhérentes qui restreignent la motilité cellulaire, permettra aux cellules tumorales de migrer jusqu'aux vaisseaux sanguins pour entrer dans la circulation et former des foyers métastatiques dans des sites distants. Le processus inverse, la transition mésenchymo-épithéliale (MET) est fréquemment observée dans la formation de métastases et favorise l'établissement et la croissance des cellules cancéreuses dans les tissus distants.

Tiré et modifié de van Denderen et Thompson; Autorisation #20133397171494195

Table 1
The EMT proteome

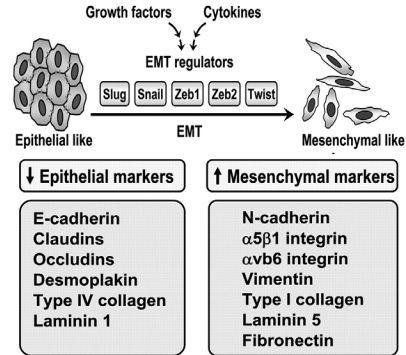
Le protéome de l'EMT

Proteins gained or maintained:

Snail
Slug
Scratch
SIP1
E47
Ets
FTS binding protein
RhoB
FSP1
TGF- β
FGF-1,-2,-8
MMP-2
MMP-9
Vimentin
 α SMA
Fibronectin
Collagen type I
Collagen type III
Thrombospondin
PAI-1

Proteins attenuated:

E-cadherin
 β -catenin
Desmoplakin
Muc-1
ZO-1
Syndecan-1
Cytokeratin-18



Kalluri et al., J.Clin.Invest, 2003

Shih et Yang, Carcinogenesis, 2011

Table 1 – Le protéome de l'EMT

Le protéome de l'EMT; résumé des modulations du protéome observées durant le processus de transition épithélio-mésenchymateuse.

Tiré et modifié de Kalluri et Neilson, 2003; (License #3397180720901);
Shih et Yang, 2011; (License #3397180867260)

D'autres répresseurs de la E-cadhérine ont aussi été rapportés pour être impliqués dans l'induction de l'EMT. C'est notamment le cas de E47, Twist, SIP1, Goosecoid et FOXC2 (Batlle et al., 2000; Peinado et al., 2004; 2007; Wang et al., 2013). Une fois exprimés ou activés, ces facteurs de transcription vont coopérer et coordonner le programme transcriptionnel de l'EMT. Ceci entraînera une déstabilisation des jonctions adhérentes et de l'adhésion cellule-matrice médiée par les intégrines, favorisant la migration, l'invasion et la formation de métastases (Jeanes et al., 2008; Schmalhofer et al., 2009). D'ailleurs, les cellules de carcinomes ayant acquis un phénotype de cellules mésenchymateuses et qui en expriment les marqueurs sont principalement localisées au front invasif de la tumeur primaire et sont considérées comme les cellules qui vont éventuellement entraîner la cascade d'invasion/métastase (Yang et Weinberg, 2008). Il existe un certain paradoxe concernant l'EMT qui vient du fait que les cellules migratrices cancéreuses qui ont formé les métastases à distance ne possèdent plus les propriétés mésenchymateuses des cellules du carcinome invasif dont elles sont issues. Le modèle proposé est que l'EMT facilite la dissémination des cellules métastatiques, mais que l'établissement dans le tissu et la

formation des tumeurs secondaires nécessitent la perte de ces caractéristiques mésenchymateuses et ce, via le processus inverse nommé MET (Zeisberg et al., 2005).

Plusieurs mécanismes moléculaires et voies de signalisation sont maintenant connus pour promouvoir ou induire une transition épithélio-mésenchymateuse. C'est notamment le cas de facteurs de croissance tels que le HGF, EGF, PDGF et TGF- β (Thiery, 2002; Shi et Massague, 2003), des récepteurs à activité tyrosine kinase qui leur sont associés, des intégrines β 4, α 5 β 1 et α V β 6 (Tse et al., 2007), de même la protéine Src, β -caténine et les petites GTPases telles que RAS (Guraino et al., 2007). De plus, certaines études ont rapporté que l'activation du sentier PI3K/Akt est également impliquée dans l'induction de l'EMT des CEIs. Par exemple, l'expression de PRL-3 dans les cellules DLD-1, une phosphatase associée à la formation de métastases colorectales, cause une réduction de l'expression de PTEN et promeut l'EMT via l'activation de la signalisation de la PI3K (Wang et al., 2007). De façon similaire, la voie de signalisation KRAS/ERK semble être fortement impliquée dans l'induction de l'EMT. En effet, l'expression de HRAS^{G12V} (Schmidt et al., 2005) ou de v-KRAS (Schoenenberger et al., 1991), dans les cellules RIE et MDCK, induit une diminution de l'adhésion cellule-cellule attribuable à une réduction de l'expression ou une localisation aberrante de la E-cadhérine. De même, la surexpression de c-RAF, une cible bien connue de RAS, cause une perte de la polarité et des contacts cellule-cellule de la lignée MDCK (Lehmann et al., 2000). À l'inverse, l'inhibition de MEK1/2 prévient le changement morphologique associé à l'EMT dans plusieurs modèles de cellules épithéliales (Yue et Mulder, 2000; Chen et al., 2012; Lehmann et al., 2000; Potempa et Ridley, 1998). D'un autre côté, l'étude de Pollock et collaborateurs a démontré que la délétion de la forme oncogénique endogène de KRAS^{G13D} dans les HCT116, n'est pas suffisante pour rétablir l'expression de la E-cadhérine de même que la formation de jonctions adhérentes. Cette délétion permet, par contre, de restaurer la capacité de ces cellules à établir des complexes d'adhésions focales et à assembler ses fibres de stress. Ce phénotype s'accompagne d'une augmentation de l'adhésion cellule-matrice sur substrat de collagène (Type I et IV), de laminine et de fibronectine en plus de réduire la motilité cellulaire (Pollock et al., 2005).

4.2.4 Angiogenèse et formation de métastases

Les cellules tumorales ont des besoins importants en oxygène et en nutriments pour survivre et proliférer. Pour permettre de répondre aux besoins métaboliques croissants, les cellules cancéreuses vont induire la formation de nouveaux capillaires sanguins par un processus appelé angiogenèse. En absence de ces vaisseaux sanguins, seule la diffusion passive permet l'apport d'éléments nutritifs de même que le rejet des déchets dans le milieu extracellulaire, ce qui limite de façon importante la croissance tumorale. Comme dans la majorité des cancers, la néovascularisation des tumeurs joue un rôle critique dans la progression, l'expansion et la dissémination des cellules métastatiques issues de tumeurs d'origine colorectale. Notamment, l'induction de l'angiogenèse est associée à un mauvais pronostic de survie et à une fréquence élevée de récurrence du cancer colorectal (Takebayashi et al., 1996; Vermeulen et al., 1999). L'activation du processus angiogénique est contrôlée par une balance entre la sécrétion des molécules pro-angiogéniques (VEGF, FGF, PDGF) et des molécules anti-angiogéniques (angiostatine, thrombospondine). Les nouveaux capillaires tumoraux sont désorganisés, dilatés et perméables (Dreher et al., 2006); ils participent ainsi à la dissémination des cellules cancéreuses dans l'ensemble de l'organisme ce qui entraînera la formation de métastases. C'est pour cette raison que des molécules permettant l'inhibition de l'angiogenèse sont actuellement en essais cliniques sur une large gamme de cancer incluant le cancer colorectal (Ivy et al., 2009). L'utilisation d'un anticorps dirigé contre le VEGF, le Bevacizumab, démontre des propriétés anti-angiogéniques intéressantes en clinique et est présentement utilisé en combinaison avec la chimiothérapie. Le Bevacizumab augmente de façon significative la survie (20-25 mois) de patients atteints d'un cancer colorectal métastatique (Segal et Saltz, 2009).

L'activation des cascades de signalisation KRAS/ERK1/2 et PI3K/Akt a maintes fois été impliquée dans le contrôle de l'expression transcriptionnelle du VEGF. En effet, ces deux voies participent à l'induction du VEGF, probablement via la régulation du facteur de réponse à l'hypoxie HIF-1 (Blancher et al., 2001; Sodhi et al., 2001) ainsi que via une augmentation du potentiel de transactivation du promoteur du VEGF (Milanini et al., 1998; Richard et al., 1999). En autres, les inhibiteurs de MEK1/2 et de PI3K bloquent l'expression du VEGF induite par le traitement au HGF des cellules CRC (Zhang et al.,

2007). De manière intéressante, les tumeurs issues de lignées cellulaires possédant la forme mutante et active de KRAS, de même que la surexpression de la forme active de HRAS dans plusieurs lignées de CEIs, causent une augmentation de la synthèse et de la production du VEGF-A (Arbiser et al., 1997; Matsuo et al., 2009; Okada et al., 1998; Rak et al., 1995). À l'inverse, l'abolition de la forme oncogénique de KRAS, par recombinaison homologue, oligonucléotides antisens ou ribozymes, permet de renverser l'augmentation de l'expression du VEGF dans plusieurs lignées cancéreuses humaines (Rak et al., 1995; Ross et al., 2001; Tokunaga et al., 2000). Ainsi, la production du VEGF découlant de l'activation oncogénique de KRAS semble jouer un rôle clé dans l'angiogenèse tumorale. En effet, l'utilisation d'ARN interférent dirigé contre le VEGF réduit le potentiel tumorigénique *in vivo* des cellules DLD-1 et HCT116 qui possèdent une mutation activatrice du gène KRAS (Okada et al., 1998). Par contre la surexpression du VEGF n'est pas suffisante pour restaurer la perte du potentiel tumorigénique causé par l'abolition de la forme oncogénique de KRAS. D'autres facteurs, contrôlés par KRAS, coopèrent avec le VEGF pour induire l'angiogenèse tumorale tels que VEGFR2, EGFR, COX2 et TSP-1 (Matsuo et al., 2009; Zeng et al., 2010). Par exemple, l'expression de la forme active de KRAS réduit l'expression de la protéine TSP-1, tant dans les fibroblastes (Lawler, 2002) que dans les cellules épithéliales BT549 (Volpert et al., 1995) et IEC-18 (Rak et al., 2000) en culture. TSP-1 est une glycoprotéine extracellulaire impliquée dans les interactions cellule-cellule et cellule-matrice, notamment elle régule de façon négative l'angiogenèse (Adams, 2001). Chez la souris, l'inactivation du gène TSP-1 augmente le nombre et le niveau de dysplasie des adénomes colorectaux induits par la mutation d'*APC* (Gutierrez et al., 2003), suggérant son implication dans l'initiation et la progression tumorale.

4.3 Implication de la voie Wnt/ β -caténine dans la tumorigénèse intestinale.

La régulation aberrante du sentier de signalisation Wnt/ β -caténine est un évènement majeur et très fréquent de la carcinogénèse colorectale. Dans la majorité des cancers colorectaux, soient dans près de 70%-80% des cas, le développement du cancer débute par la formation d'adénomes résultant de mutations causant la perte de fonction du gène suppresseur de tumeurs *APC* (Fearon et Vogelstein, 1990; Jass, 2007). Chez la souris, la mutation perte de fonction d'*APC* (modèle *APC*^{Min/+}) induit la suractivation de la voie Wnt/ β -caténine et est

associée à une augmentation de la prolifération cellulaire ainsi qu'à un allongement du compartiment cryptal (Andreu et al., 2005). Le premier type de lésion observable du cancer du côlon est la formation de cryptes aberrantes (cryptes hyperplasiques), dont l'apparition est majoritairement attribuable à des mutations dans le gène *APC* ou autres régulateurs de la voie Wnt (Gregorieff et Clevers, 2005). La perte de fonction d'un allèle d'*APC* chez l'humain est associée au développement de la polypose adénomateuse familiale (FAP), une maladie autosomale dominante caractérisée par la formation de nombreux polypes intestinaux. Cette mutation est aussi un évènement initiateur de la carcinogénèse colorectale de type sporadique (Kinzler et Vogelstein, 1996). Elle est associée à une stabilisation de la β -caténine, ce qui mènera à son accumulation nucléaire subséquente et à son association avec le co-facteur transcriptionnel TCF4. Ainsi, ensemble ils formeront un complexe transcriptionnel permettant l'expression de gènes cibles tels que la *cycline D1* et *c-myc*, deux régulateurs importants de la prolifération des CEIs (Morin, 1999; Polakis, 1999). Cette hausse d'expression explique en partie le mécanisme par lequel l'accumulation de la β -caténine initie la formation d'adénomes dans l'intestin. Plusieurs études sur des modèles murins ont d'ailleurs démontré que le proto-oncogène *c-myc* est essentiel à la polypose intestinale associée au phénotype des souris *APC^{Min/+}* (Yekkala et Baudino, 2007; Ignatenko et al., 2006; Sansom et al., 2007).

Le modèle murin *APC^{Min/+}* supporte ainsi un rôle direct de l'activité transcriptionnelle de la β -caténine et de ses gènes cibles dans la tumorigénèse intestinale (Hinoi et al., 2007; Kongkanuntn et al., 1999; Sansom et al., 2004; Sansom et al., 2007). Ces études démontrent que la dérégulation et l'accumulation nucléaire de la β -caténine coïncident avec le développement d'adénomes chez la souris. Des mutations stabilisatrices de la β -caténine sont également retrouvées dans près de 7% des cancers sporadiques humains (Iwao et al., 1998; Morin et al., 1997; Sparks et al., 1998). Conséquemment, les modèles transgéniques possédant une mutation stabilisatrice de la β -caténine développent eux aussi plusieurs adénomes intestinaux (Romagnolo et al., 1999). Dans l'ensemble, ces études démontrent que la dérégulation de la β -caténine est l'élément moléculaire majeur induit par la perte de fonction du gène *APC*, responsable de l'initiation et de la progression de la carcinogénèse colorectale.

Malgré les nombreuses évidences supportant l'augmentation de la localisation nucléaire de la β -caténine résultant de la perte de fonction d'*APC*, certaines études ont rapporté l'absence de son accumulation nucléaire dans plusieurs adénomes humains présentant des mutations du gène *APC*. Par exemple, Anderson et collaborateurs ont examiné la localisation cellulaire de la β -caténine dans plus de 50 tissus sains et adénomes humains d'origine familiale (FAP) et ont été incapables de détecter une accumulation nucléaire dans plus de 90% des adénomes analysés. À l'inverse, une accumulation nucléaire est retrouvée dans pratiquement tous les adénocarcinomes et carcinomes présentant les mêmes mutations du gène *APC* (Anderson et al., 2002). De façon similaire, Blaker et collaborateurs ont comparé les niveaux nucléaires de la β -caténine dans des adénomes précoces présentant un faible niveau de dysplasie en comparaison avec des adénomes tardifs fortement dysplasiques, tous possédant la mutation du gène *APC*. Ils ont observé que l'augmentation de la β -caténine est confinée au cytoplasme dans les adénomes précoces, tandis qu'elle est nucléaire dans les adénomes tardifs (Blaker et al., 2003). Suite à ces observations, les deux groupes ont conclu que la perte hétérozygotie d'*APC*, à elle seule, est insuffisante pour mener à l'accumulation nucléaire de la β -caténine chez l'humain. En accord avec ces observations, le modèle de rat transgénique PIRC, qui porte une forme tronquée d'*APC*, présente une localisation nucléaire de la β -caténine seulement dans les adénomes tardifs (Amos-Landgraf et al., 2007). Dans l'ensemble, ces études proposent que l'accumulation nucléaire de la β -caténine requière d'autres altérations moléculaires ou génétiques en plus de la perte de fonction du gène *APC*. Cette hypothèse est en accord avec le modèle «*multi-hit*» proposé par Fearon et Vogelstein dans lequel le développement de tumeurs du côlon nécessite l'accumulation d'un certain nombre d'altérations génétiques.

4.4 Implication de la voie RAS/ERK MAP kinase dans la tumorigénèse intestinale.

Dans les cancers non héréditaires du côlon, jusqu'à 40 % des tumeurs possèdent des mutations somatiques de l'un des gènes *RAS*. Au niveau de l'isoforme *KRAS*, on retrouve typiquement des substitutions nucléotidiques sur les codons 12, 13, 61 et 146, ces dernières conduisent à la stabilisation de sa forme active liée au GTP (Schubbert et al., 2007). Bien que le gène *KRAS* soit le plus fréquemment muté (particulier sur son codon 12), on retrouve tout de même 3 à 7% des cancers colorectaux mutés pour le gène *NRAS* et ce, de manière

mutuellement exclusive avec les mutations *KRAS* (Vaughn et al., 2011). De même, le gène *BRAF* est muté dans 5 à 12 % des cancers colorectaux, uniquement en absence de mutation du gène *KRAS*. Plus de 90 % des mutations de *BRAF* touche une substitution T>A sur le nucléotide 1796, conduisant à la substitution V>E du codon 600 qui stabilise la forme active de BRAF (Wan et al., 2004).

Les mutations de *KRAS* et *BRAF* sont retrouvées de manières mutuellement exclusives dans les cancers colorectaux (Yuen et al., 2002; Li et al., 2006), ce qui suggère que la signalisation en aval de BRAF doit être fortement impliquée dans le signal oncogénique induit par *KRAS* (Niault et Baccarini, 2010). De nombreux modèles animaux ont été générés pour évaluer *in vivo* la fonction ontogénique de *KRAS* et *BRAF* dans l'initiation de la tumorigénèse colorectale (Karreth et Tuveson, 2009). Plus particulièrement, l'équipe de la P^{te} Robine a montré que l'expression de *KRAS*^{G12V} dans les CEIs, sous le contrôle de la région régulatrice du gène murin de la *villine*, conduisait à la formation de tumeurs intestinales (Janssen et al., 2002). L'apparition tardive et d'un nombre limité de tumeurs peut rappeler la pathologie du cancer colorectal chez l'homme, bien que les tumeurs soient principalement localisées dans le l'intestin grêle proximal plutôt que dans le côlon. Au niveau histologique, ces tumeurs sont essentiellement des adénomes tubulo-glandulaires et plus rarement des adénocarcinomes invasifs. De façon intéressante, la surexpression de *KRAS*^{G12V} induit une augmentation de l'activité de ERK1/2 au niveau de la muqueuse intestinale, suggérant que ces kinases effectrices puissent être impliquées dans l'initiation de la tumorigénèse (Janssen et al., 2002). Par la suite, d'autres modèles murins ont été développés utilisant la recombinaison Cre afin d'induire l'expression des oncogènes *KRAS* (Haigis et al., 2008) ou *BRAF* (Carragher et al., 2010) sous le contrôle de leur propre promoteur (*Lox-STOP-Lox-(LSL)KRAS*^{G12D} et *LSL-BRAF*^{V600E}). Ainsi l'expression à des niveaux endogènes de *KRAS*^{G12D} ou de *BRAF*^{V600E} spécifiquement dans l'épithélium intestinal entraîne en moins de trois mois une hyperplasie épithéliale qui semble dépendante de l'activation des kinases MEK (bloquée par l'utilisation du CI-1040, un inhibiteur de MEK) et à long terme à la formation d'adénomes festonnés (Haigis et al., 2008; Carragher et al., 2010). Cependant, ces adénomes ne progressent pas en adénocarcinomes, suggérant que des altérations génétiques supplémentaires sont requises

pour permettre la progression tumorale. Ainsi, l'activation des oncogènes KRAS ou BRAF, à elle seule, n'est pas suffisante pour le développement du cancer colorectal. L'analyse phénotypique détaillée de l'épithélium de ces souris a d'ailleurs révélé que les cryptes hyperplasiques entrent en sénescence, probablement induite par l'expression de l'inhibiteur du cycle cellulaire p16^{INK4A} (Carragher et al., 2010; Bennecke et al., 2010). D'ailleurs, l'inactivation concomitante du locus *Ink4a/Arf* (Carragher et al., 2010; Bennecke et al., 2010) ou des gènes suppresseurs de tumeurs *APC* (Sansom et al., 2006) ou *TGFβ2-R* (Trobridge et al., 2009) conduit au développement plus précoce et rapide de tumeurs intestinales invasives et métastatiques. Ces évidences suggèrent un modèle dans lequel les formes activées de KRAS ou BRAF sont impliquées dans le processus d'initiation tumorale tandis que l'absence du locus *Ink4a/Arf* ou des gènes *APC* et *TGFβ2-R* jouerait un rôle dans la conversion maligne en adénocarcinomes invasifs.

Concernant les effecteurs en aval de KRAS et BRAF, il a été démontré que les protéines MEK1/2 sont phosphorylées et activées dans 30-40% des adénomes et dans près de 76% des tumeurs humaines d'origine colorectale (Lee et al., 2004; Hoshino et al., 1998; Yeh et al., 2009). Certaines études ont également démontré une élévation de l'activité ERK dans les lignées de cellules CRC en culture (Hoshino et al., 1998, ; Kress et al., 2010; Duhamel et al., 2012) ainsi dans certaines tumeurs humaines (Kuno et al., 1998;; Yeh et al., 2009, Schmitz et al., 2007). Inversement, certaines études ont rapporté l'absence d'augmentation de l'activité des ERK1/2 (Licato et al. 1998; Haigis et al., 2008; Nemoto et al., 2005) voire l'inactivation de ces kinases dans des tumeurs colorectales (Eggstein et al., 1999; Wang et al., 2000). Par exemple, une analyse de 190 tissus de patients atteints du cancer du côlon a montré que l'activation cytoplasmique de ERK1/2 corrèle avec le statut de mutation de BRAF, mais pas avec celui de KRAS (Yeh et al., 2009). De façon similaire, l'analyse de tissus issus de cancers pancréatiques montre un très faible niveau de corrélation entre les mutations de KRAS et le statut d'activation des kinases ERK1/2 (Yip-Schneider et al., 1999). De manière intéressante, notre groupe a récemment démontré que l'activité des kinases ERK1/2, dans les cellules CRC humaines exprimant les formes mutantes de KRAS ou BRAF, est relativement faible et principalement retrouvée dans le cytoplasme (Cagnol et Rivard, 2013). De plus, les résultats obtenus sur la régulation spatio-temporelle de

l'activation des ERK (en réponse à l'expression d'une forme inductible de l'oncogène BRAF^{V600E}) suggèrent d'ailleurs que les kinases ERK1/2 sont rapidement activées puis inactivées dans le noyau suite à une stimulation oncogénique. De manière intéressante, une analyse de l'expression de plusieurs DUSPs suggère que la phosphatase DUSP4 pourrait être responsable de cette inactivation nucléaire des kinases ERK1/2.

Plusieurs études démontrent que l'activité MEK/ERK est requise pour la prolifération des cellules CRC en culture (Voisin et al., 2008; Kress et al., 2010), pour leur croissance en indépendance d'ancrage (Yeh et al., 2009;) de même que pour leur croissance en xénogreffes (Sebolt-Leopold et al., 1999; Voisin et al., 2008). De plus, les inhibiteurs de MEK1/2 bloquent la croissance des polypes chez la souris *APC^{Min/+}* (Lee et al., 2010). Face au rôle important de l'activité des effecteurs de l'oncogène KRAS, plusieurs inhibiteurs ont été développés visant à bloquer les modifications post-traductionnelles permettant sa pleine activation. Notamment des inhibiteurs de farnésyltransférase ont été générés, une enzyme nécessaire au recrutement de RAS à la membrane et à son activation. De façon surprenante, un faible taux de succès a été obtenu en étude clinique de phase III (Van Cutsem et al., 2004), suscitant ainsi l'intérêt de cibler plutôt les kinases effectrices, soit RAF et MEK (Rusconi et al., 2012). En conséquence, un effort particulier a été déployé au cours des dernières années pour développer des inhibiteurs de ces kinases dans le but de traiter le cancer colorectal et autres types de cancers (Roberts et al., 2007). Les inhibiteurs sélectifs des kinases MEK1 et MEK2 sont des molécules intéressantes pour minimiser les effets "off-target" étant donné que les kinases ERK1/2 sont essentiellement les seuls substrats connus (Pearson et al., 2001; Kolch, 2000; Wei, 2011). Le CI-1040, un inhibiteur très spécifique de MEK1 et MEK2, a été le premier agent de cette classe à entrer en essais cliniques chez l'humain (Frémin et Meloche, 2010). D'abord prometteur lors des essais cliniques de phase I effectués sur une large gamme de tumeurs (Lorusso et al., 2005), le CI-1040 a malheureusement démontré des résultats décevants en essais cliniques de phase II (Rinehart et al., 2004). Étant donné ce succès mitigé du premier inhibiteur de MEK1/2, plusieurs molécules ont nouvellement été développées et sont actuellement en phase I/II d'essais cliniques (AZD6244, AS703026, XL518, RDEA119 et ARRY-162; Adjei et al., 2008; Wang et al., 2007; Rusconi et al., 2012). Récemment, deux inhibiteurs de MEK1/2

(Trametinib et Dabrafenib) ont reçu l'approbation de la FDA pour le traitement de mélanomes métastatiques (*FDA.gov/drugs*). L'espoir est grand face à ces nouveaux inhibiteurs qui montrent de meilleures propriétés pharmaceutiques ainsi qu'une réduction des effets adverses sur le système nerveux central.

4.5 Implication de la signalisation dépendante de MEK dans la transformation des CEIs normales en culture.

Plusieurs études ont démontré que la surexpression des formes constitutivement actives de KRAS, HRAS, ou même de MEK1 dans des lignées cellulaires immortalisées d'origine intestinale (IEC-6, IEC-18, RIE-1) était suffisante pour induire leur transformation cellulaire (Boucher et al., 2004; Komatsu et al., 2005; Yoakum et al., 1985; Rhim, 1989; White et al., 1995). Il a été démontré que cette transformation était attribuable à l'acquisition de propriétés associées aux cellules cancéreuses, notamment un besoin réduit en facteurs de croissance pour leur prolifération, une capacité à croître en indépendance d'ancrage et de résister à l'anoikose. Il est cependant important de noter que l'expression d'une forme oncogénique de MEK1 (Boucher et al., 2004) ou de KRAS (données non publiées du laboratoire) dans des cellules épithéliales intestinales humaines non immortalisées (HIEC) conduit plutôt à une sénescence prématurée associée à la surexpression de p53 et des inhibiteurs du cycle cellulaire p21^{CIP1} et p16^{INK4A}. À cet égard, l'entrée prématurée en sénescence est reconnue aujourd'hui comme une « barrière proliférative » s'opposant à l'immortalisation cellulaire et donc au développement tumoral (Narita et Lowe, 2004). Dans l'ensemble, ces observations supportent la notion que la signalisation dépendante de MEK joue un rôle crucial dans l'induction de la transformation des CEIs. Néanmoins, les mécanismes moléculaires impliqués restaient à caractériser et on fait l'objet de mon projet de doctorat.

5 Hypothèses et objectifs

L'ensemble de mon projet de recherche repose sur l'hypothèse que *la signalisation MEK/ERK est impliquée dans l'initiation et la progression du cancer colorectal*. Mes travaux de doctorat se divisent en quatre objectifs de recherche se rapportant au rôle de la signalisation MEK/ERK dans différents processus cellulaires associés à la tumorigénèse colorectale.

1. *Évaluer le rôle et l'importance de l'inhibition de l'activité MEK/ERK durant la différenciation entérocytaire.*

Les travaux précédents réalisés dans notre laboratoire ont démontré une inactivation sélective des kinases ERK1/2 durant le processus de différenciation entérocytaire. Le rôle exact et la nécessité de cette inactivation dans l'arrêt de prolifération et dans l'induction de la différenciation des cellules épithéliales intestinales restaient à clarifier. Nous avons émis l'hypothèse que cette inhibition était nécessaire au processus de différenciation entérocytaire puisque leur activation était associée à un état prolifératif et indifférencié. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons caractérisé l'impact du maintien d'une activité MEK élevée, par l'expression de la forme constitutive active de MEK1, durant le processus de différenciation des cellules Caco-2/15 et IEC-6/Cdx3, deux modèles de différenciation entérocytaire.

2. *Caractériser l'impact d'une activation constitutive de MEK1 sur la transformation oncogénique des cellules épithéliales intestinales.*

Une étude effectuée dans notre laboratoire a démontré que l'activation constitutive MEK1 est suffisante pour induire la transformation des cellules épithéliales intestinales IEC-6 en culture (Boucher et al., 2004). Nous avons émis l'hypothèse que cette activation pouvait être suffisante pour induire la tumorigénèse épithéliale intestinale et l'invasion *in vivo*. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons utilisé des modèles de xénogreffes pour évaluer le potentiel des cellules épithéliales intestinales transformées par la forme oncogénique de MEK1 à former des tumeurs invasives. De plus, nous avons caractérisé les mécanismes

moléculaires potentiellement impliqués.

3. *Identifier et caractériser la serpineE2 comme étant une cible moléculaire de l'activité oncogénique du sentier KRAS/ERK MAP kinase et analyser sa contribution dans la tumorigénèse intestinale.*

Dans le but de mieux comprendre les mécanismes moléculaires par lesquels la forme constitutive active de MEK1 induit la tumorigénèse intestinale, une analyse comparative par micropuce d'ADN Affymetrix a été effectuée. Le gène encodant pour la *serpineE2* (*Serpin clade E member 2*), un inhibiteur de protéase à sérine, s'est révélé être le gène le plus fortement induit dans les CEIs transformées par caMEK1. Nous avons formulé l'hypothèse que la serpineE2 était une cible moléculaire de l'activité oncogénique de la voie KRAS/ERK et nous avons évalué son importance dans la tumorigénèse intestinale par l'utilisation d'ARN interférents.

4. *Déterminer la contribution du sentier Wnt/ β -caténine dans la transformation des cellules épithéliales intestinales induite par l'activation oncogénique de la voie KRAS/BRAF/MEK/ERK.*

La dérégulation de la voie Wnt/ β -caténine, associée à la perte de fonction d'APC, est un évènement majeur et très fréquent menant au développement du cancer du côlon. Ceci conduit à une accumulation nucléaire de la β -caténine associée à l'augmentation de ses gènes cibles impliqués dans la prolifération cellulaire et la tumorigénèse. Même si la voie KRAS/MAP kinase et la voie Wnt/ β -caténine sont les deux principales voies de signalisation pouvant mener aux développements de tumeurs colorectales, peu d'études ont évalué leur potentielle interaction durant le processus de carcinogénèse. Nous avons émis l'hypothèse que ces deux voies s'interconnectaient pendant la transformation et la tumorigénèse des cellules épithéliales intestinales. Nous avons donc analysé la contribution du sentier Wnt/ β -caténine dans la transformation des cellules épithéliales induite par l'activation oncogénique de KRAS, BRAF ainsi que MEK1 et corrélié ces observations dans les cellules CRC et tumeurs humaines.

Liste des manuscrits

- 1 Manuscrit 1 :** «*Constitutive activation of MEK/ERK pathway inhibits intestinal epithelial cell differentiation*» Lemieux et al., Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2011 Oct;301(4):G719-30.
- 2 Manuscrit 2 :** «*Constitutively active MEK1 is sufficient to induce epithelial-to-mesenchymal transition in intestinal epithelial cells and to promote tumor invasion and metastasis*» Lemieux et al., Int J Cancer. 2009 Oct 1;125(7):1575-86
- 3 Manuscrit 3 :** «*The serine protease inhibitor serpinE2 is a novel target of ERK signaling involved in human colorectal tumorigenesis*» Bergeron, Lemieux et al., Molecular Cancer. 2010 Oct 13;9:271.
- 4 Manuscrit 4 :** «*Oncogenic KRAS signalling promotes Wnt/ β -catenin pathway through LRP6 in colorectal cancer*» Lemieux et al., (Soumis à la revue Oncogene en date du 22 avril 2014. # de soumission: ONC-2014-00853)

Résultats

Manuscrit 1. Constitutive activation of MEK/ERK pathway inhibits intestinal epithelial cell differentiation.

Etienne Lemieux¹, Marie-Josée Boucher², Sébastien Mongrain¹, François Boudreau¹, Claude Asselin¹ and Nathalie Rivard^{1*}

¹ Department of Anatomy and Cellular Biology, CIHR Team on Digestive Epithelium.

² Service of Gastroenterology. Faculty of Medicine and Health Sciences, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada

Statut de l'article : Publié - Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2011 Oct;301(4):G719-30

Avant-propos

Plusieurs évidences supportent l'implication de l'activité de la voie RAS/RAF/MEK/ERK dans la prolifération des cellules épithéliales intestinales (Aliaga et al., 1999; Laprise et al., 2004). Les formes actives de ERK1/2 sont retrouvées de façons prédominantes dans le noyau des cellules prolifératives et indifférenciées de la crypte intestinale humaine alors que cette activité est faiblement détectée dans les cellules différenciées qui composent la villosité. La différenciation terminale des cellules épithéliales intestinales est associée à un arrêt du cycle cellulaire, ce processus corrèle avec le niveau d'activation de la voie de signalisation RAS/ERK. En effet, les travaux précédents réalisés dans notre laboratoire ont démontré une inactivation sélective des kinases ERK1/2 durant le processus de différenciation entérocytaire. La nécessité de cette inactivation dans l'arrêt de prolifération et dans l'induction de la différenciation des CEI restait à clarifier. Nous avons émis l'hypothèse que cette inhibition était nécessaire au processus de différenciation entérocytaire et que le maintien de l'activité garderait les cellules dans un état indifférencié. Pour vérifier cette hypothèse, j'ai caractérisé l'impact du maintien d'une activité MEK/ERK élevée, par l'expression de la forme constitutive active de MEK1, durant le processus de différenciation des cellules Caco-2/15 et IEC-6/Cdx3.

Contribution

J'ai généré les populations cellulaires des deux modèles de différenciation entérocytaire. J'ai effectué la totalité des expériences sur ces modèles cellulaires, incluant les essais luciférases, les immunobuvardages, les RT et qPCR ainsi que les immunofluorescences. L'essai de retard sur gel a été effectué par Sébastien Mongrain (Fig.6F) et Marie-Josée Boucher a réalisé les résultats préliminaires sur les Caco-2/15. J'ai dirigé le projet de recherche, rédigé la première version du manuscrit, préparé les figures et effectué les expériences pour satisfaire les évaluateurs. François Boudreau et Claude Asselin ont révisé le manuscrit avant soumission et ont apporté leur expertise à l'amélioration des conclusions de l'étude et du manuscrit. Nathalie Rivard a participé et coordonné la conception de l'étude de même que la rédaction du manuscrit.

Résumé

L'expression du facteur de transcription Cdx3 dans les cellules cryptales intestinales IEC-6 induit un programme de différenciation entérocytaire suivant l'atteinte de la confluence. On observe la formation de structures multicellulaires, l'apparition de microvillosités, une polarisation cellulaire et l'expression de marqueurs de différenciation entérocytaire. De façon concomitante avec l'induction de la différenciation, on observe une forte diminution de l'activité ERK1/2, cette réduction est maintenue durant tout le processus. L'expression d'une forme active de MEK1 (caMEK1) prévient l'inhibition de l'activité ERK1/2 des cellules IEC-6/Cdx3 à post-confluence, maintenant une activité ERK1/2 élevée durant la différenciation. Au niveau morphologique, on observe alors une forte altération de la différenciation entérocytaire, notamment une altération de l'architecture multicellulaire, une diminution des microvillosités à la surface apicale ainsi qu'une désorganisation des jonctions cellulaires. L'expression de cette forme constitutive active de MEK1 augmente la phosphorylation de Cdx3 sur la sérine 60, ce qui a pour effet de diminuer son activité transcriptionnelle et sa capacité à induire l'expression de gènes importants pour l'induction et le maintien de la différenciation terminale des cellules épithéliales intestinales. Les résultats de cet article démontrent que l'inactivation des kinases ERK1/2 est requise pour permettre la pleine différenciation des CEIs. L'inhibition de l'activité ERK1/2 contribue fort probablement l'arrêt de prolifération précédant la différenciation des CEIs en plus de

permettre la pleine activation des facteurs de transcription Cdx2 et HNF1 α nécessaire à l'expression de marqueurs de différenciation entérocytaire.

Abstract

The Ras/Raf/MEK/ERK cascade regulates intestinal epithelial cell proliferation. Indeed, while barely detectable in differentiated cells of the villi, ERK1/2 activated forms are detected in the nucleus of undifferentiated human intestinal crypt cells. In addition, we and others have reported that ERKs are selectively inactivated during enterocyte differentiation. However, whether inactivation of the ERK pathway is necessary for inhibition of both proliferation and induction of differentiation of intestinal epithelial cells is unknown. Methods: Human Caco-2/15 cells, undifferentiated crypt IEC-6 cells and differentiating Cdx3-expressing IEC-6 cells were infected with retroviruses encoding either a HA-tagged MEK1 wild type (wtMEK) or a constitutively active S218D/S222D MEK1 mutant (caMEK). Protein and gene expression was assessed by Western blotting, semi-quantitative RT-PCR and real-time PCR. Morphology was analyzed by transmission electron microscopy. Results: 1- IEC-6/Cdx3 cells formed multicellular layers after confluence and differentiated after 30 days in culture, as assessed by increased polarization, microvilli formation, expression of differentiation markers and ERK1/2 inhibition. 2- While activated MEK prevented neither the inhibition of ERK1/2 activities nor the differentiation process in post-confluent Caco-2/15 cells, caMEK expression prevented ERK inhibition in post-confluent IEC-6/Cdx3 cells, thus leading to maintenance of elevated ERK1/2 activities. 3- caMEK-expressing IEC-6/Cdx3 cells exhibited altered multicellular structure organization, poorly defined tight junctions, reduced number of microvilli on the apical surface, and decreased expression of the HNF1 α transcription factor and differentiation markers, namely ApoA4, FABP, Calbindin-3, MUC2, alkaline phosphatase and sucrase-isomaltase. 4- Increased Cdx3 phosphorylation on serine 60 (S60) in IEC-6/Cdx3 cells expressing caMEK led to decreased Cdx2 transactivation potential. Conclusion: These results indicate that inactivation of the ERK pathway is required to insure the full Cdx2/3 transcriptional activity necessary for intestinal epithelial cell terminal differentiation.

Introduction

The small intestinal epithelium continuously and rapidly regenerates itself throughout life (35). This rapid and dynamic renewal is maintained by the crypt proliferating unit containing stem cells which give rise to four epithelial-lineage cells. While absorptive enterocytes, mucus-producing goblet cells and peptide hormone secreting enteroendocrine cells, differentiate during an upward migration from the crypt to an adjacent villus, Paneth cells differentiate during a downward movement to the base of the crypt. Therefore, despite continuous renewal, a spatially complex epithelium is maintained from crypt to villus tip and from duodenum to colon (35). One of the fundamental challenges in intestinal epithelial cell biology is to define the molecular mechanisms that regulate crypt cell proliferation and the subsequent switch to a well differentiated epithelium.

Cdx2 and its hamster ortholog Cdx3 (25) are homeodomain transcription factors related to the *Drosophila* Caudal gene, important both for pattern formation in the developing embryo and for activation of intestine-specific genes, including sucrase-isomaltase and lactase-phlorizin hydrolase (31, 55, 56, 58). Ectopic expression of Cdx2 negatively regulates intestinal epithelial and colon cancer cell proliferation while promoting a mature enterocyte phenotype consisting of a polarized and columnar cell structure, with apical microvilli and tight junctions (43, 55). Furthermore, Cdx2 is required for intestinal cell lineage specification in early mouse endoderm (22). Of note, we have previously reported a gradient of Cdx2 protein expression along the human small intestinal crypt-villus axis with higher levels being detected in differentiated epithelial cells (11). Such a pattern of Cdx2 protein expression in the intestine has also been previously reported by (31). In fact, in proliferative undifferentiated cells, Cdx2 is phosphorylated by active Cdk2-associated complexes, targeting Cdx2 for rapid degradation by the ubiquitin/proteasome pathway (11, 26, 27).

Little is known of the factors activated during the switch between proliferation and differentiation of intestinal epithelial cells. It is clear, however, that terminal differentiation is intimately linked both to cell cycle arrest (53) and to the level of activation of the Ras/RAF/MEK/MAP kinase-signalling cascade (1, 18, 39, 57). Indeed, proliferative cells

display high phospho-ERK levels, and the activation of the Ras/ERKs cascade is required for S phase entry (1, 15, 33, 50, 52). In contrast, differentiated cells display very low sustained levels of activated ERKs. Previous studies have reported that transfection of Caco-2 cells with an activated human Val-12 Ha-Ras gene represses *sucrase-isomaltase* and *villin* gene expression, suggesting that the Ras oncogene and its downstream effectors, which include ERK1/2, may exert an antagonizing effect on enterocyte-like differentiation pathways (5). Accordingly, the phosphorylated and activated forms of ERK1/2 are detected in the nucleus of undifferentiated proliferative crypt cells in human small intestine (1), hence supporting the hypothesis that this intracellular signalling pathway must be shut down for the initiation of the differentiation process.

Here, we provide the first evidence that inactivation of the ERK pathway is required for induction of intestinal epithelial cell terminal differentiation. Indeed, we show that the constitutive activation of the MEK/ERK cascade inhibits enterocyte differentiation, in part through Cdx2/3 phosphorylation resulting in inhibition of its transcriptional activity.

Results

Activated MEK does not alter Caco-2/15 cell differentiation.

We and others have reported that ERK1/2 inactivation correlates with enterocyte differentiation (1, 18, 57). However, whether ERK pathway inactivation is necessary for induction of intestinal epithelial cell differentiation is unknown. The Caco-2/15 cell line provides a well characterized model for the study of gut epithelial differentiation since these cells undergo confluence-dependent differentiation to a small-bowel like phenotype with microvilli and tight junction formation, in addition to expression of several brush border enzymes, including sucrase-isomaltase (7, 17, 36, 38, 60). Therefore, we examined the biological consequences of wtMEK1 and constitutive activated MEK1 (caMEK) overexpression in human Caco-2/15 intestinal epithelial cells after viral infection of their respective cDNA cloned in the retroviral vector pLXIN. High levels of HA-wtMEK and HA-caMEK expression were maintained in post-confluent Caco-2/15 cells, as determined by Western blot analysis with a HA antibody (Fig. 1A). As we previously reported (10, 42), little or no additional phosphorylation of ERK1/2 was detected in cells expressing the

activated MEK when cells are cultured in presence of serum. One explanation is that cells permanently stimulated by autoactive MEK1 are desensitized *via* multiple mechanisms in presence of serum growth factors including the previously reported ERK-mediated feedback inhibition of MEK, a phenomenon observed in rodent fibroblasts (10, 12, 36). Of note, however, phosphorylated ERK1/2 expression levels dramatically decreased after confluency in all cell populations, irrespective of wtMEK or caMEK expression (Fig. 1A). Importantly, caMEK expression did not interfere with the decreased phosphorylation of Rb protein (indicating a G1 arrest) observed when cells reach confluence and with the post-confluent induction of differentiation markers, such as sucrase-isomaltase (Fig.1A) and villin (not shown). Accordingly, expression of Cdx2 protein was similarly enhanced in post-confluent wtMEK and caMEK-expressing cells (Fig.1A). Finally, the morphological differentiation of Caco-2/15 was not affected by the oncogenic activation of MEK as observed by electron microscopy (Fig.1B). Hence, expression of activated MEK in Caco-2/15 cells did not prevent the inhibition of ERK1/2 activities at post-confluency and did not alter the differentiation process.

Activated MEK prevents ERK1/2 down-regulation in IEC-6/Cdx3 cells.

Previous reports have demonstrated that the overexpression of Cdx2 transcription factor in the intestinal epithelial crypt cell line IEC-6 is sufficient to induce cellular differentiation *in vitro* (56). Cdx2-expressing cells grow in multicellular layers after reaching confluence, and cells will present differentiation features after 30 days in culture. Indeed, Cdx2 promotes the acquisition of a mature enterocyte phenotype consisting of a polarized, columnar shape with apical microvilli, tight junctions and sucrase-isomaltase mRNA expression. Therefore, IEC-6 cells stably expressing Cdx2 constitutes a simpler model in which to study the molecular mechanisms involved in the induction of enterocyte differentiation. We have previously generated IEC-6 cell populations overexpressing HA-Cdx3 by retroviral infection. Cdx3 has been described as the hamster ortholog of mouse Cdx2 as indicated by sequence, DNA-binding characteristics, and function in transcriptional activation (25, 55). The complete amino acid sequence of Cdx3 is 93.6% similar to the mouse Cdx2 (55). Hence, Cdx2 and Cdx3 can be used interchangeably. As observed with Cdx2 (24, 53), ectopic expression of HA-Cdx3 promotes the acquisition of a

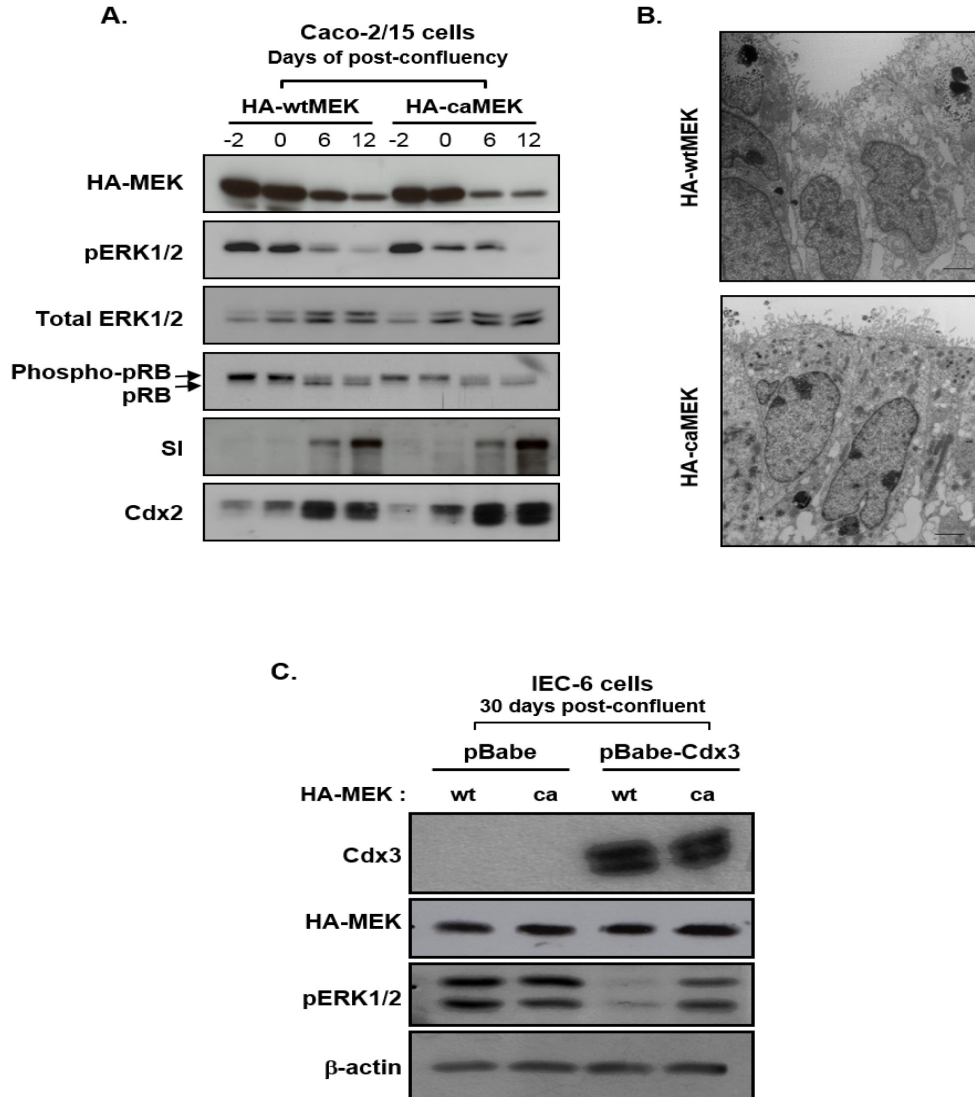


Figure 1. Effect of wtMEK and caMEK expression on ERK1/2 activities in intestinal epithelial cells. **A-** Caco-2/15 cells stably expressing HA-wtMEK or HA-caMEK were lysed at subconfluence (day -2), confluence (day 0), 6 or 12 days post-confluence. Equal amounts of proteins were separated by SDS-PAGE, and analyzed by Western blot for expression of HA-MEK, phosphorylated ERK1/2 (pERK1/2), total ERK1/2, Cdx2, pRb and sucrase-isomaltase (SI). Blots shown are representative of three independent experiments. **B-** 12 days post-confluent Caco-2/15 cells expressing HA-wtMEK or HA-caMEK were fixed in glutaraldehyde and osmium tetroxide and embedded in epoxy for transmission electron microscopy analysis. Bars: 2 μ m. Images shown are representative of three independent experiments. **C-** Control IEC-6 cells (pBabe) and IEC-6/Cdx3 cells (pBabe-Cdx3) expressing either HA-wtMEK or HA-caMEK were lysed 30 days after confluence. Equal amounts of proteins separated by SDS-PAGE were analyzed by Western blot for expression of HA-MEK, Cdx3, phosphorylated ERK1/2 (pERK1/2) and β -actin. Blots shown are representative of three independent experiments.

mature enterocyte phenotype (unpublished results). We thus verified the effect of wtMEK and caMEK overexpression on IEC-6/Cdx3 intestinal epithelial cell differentiation. Stable wtMEK expression did not alter Cdx3-induced IEC-6 cell differentiation when compared to control IEC-6/Cdx3 cells (not shown). As previously reported in differentiating Caco-2/15 cells and along the human crypt-villus axis in vivo (1), down-regulation of ERK1/2 phosphorylation was observed in post-confluent differentiating IEC-6/Cdx3 cells, in contrast to IEC-6/pBabe control cells (Fig.1C). Interestingly, and in contrast to Caco-2/15 cells (Fig.1A), caMEK expression prevented downregulation of ERK1/2 phosphorylation in IEC-6/Cdx3 cells (Fig.1C, lane 4). Thus, our results demonstrate that Cdx3 expression leads to reduced ERK1/2 activity in post-confluent cells, as opposed to IEC-6/pBabe control cells, and that expression of oncogenic MEK in Cdx3-expressing IEC-6 cells prevents ERK1/2 inhibition.

Activated MEK inhibits IEC-6/Cdx3 functional and morphological differentiation.

We next analyzed whether caMEK expression prevented IEC-6/Cdx3 cell differentiation. RT-PCR analyses showed that differentiation markers, namely apolipoprotein A-IV (ApoA-IV), Fatty acid binding protein (FABP), calbindin-3, mucin 2, intestinal alkaline phosphatase (IAP) and sucrase-isomaltase (SI), were similarly induced in control or wtMEK-expressing IEC-6/Cdx3 cells (data not shown, Fig.2A). In contrast, caMEK expression markedly inhibited Cdx3-induced expression of intestinal epithelial-specific gene transcripts.

The HNF1 α and HNF4 α transcription factors also regulate the expression of numerous intestinal genes (4, 23, 47). It has been recently reported that the maintenance of HNF1 α and HNF4 α expression in the embryonic intestine is directly and positively controlled by Cdx2 (22). As shown in Fig.2B, HNF1 α and HNF4 α mRNA levels were significantly increased in IEC-6/Cdx3 cells in comparison to IEC-6/pBabe cells. However, co-expression of activated MEK1, but not wtMEK, prevented the enhanced expression of HNF1 α in IEC-6/Cdx3 cells without affecting HNF4 α expression. The morphological aspect of these cell populations was also assessed by transmission electron microscopy. Post-confluent IEC-6/Cdx3 cells displayed multicellular structures, with columnar layer of

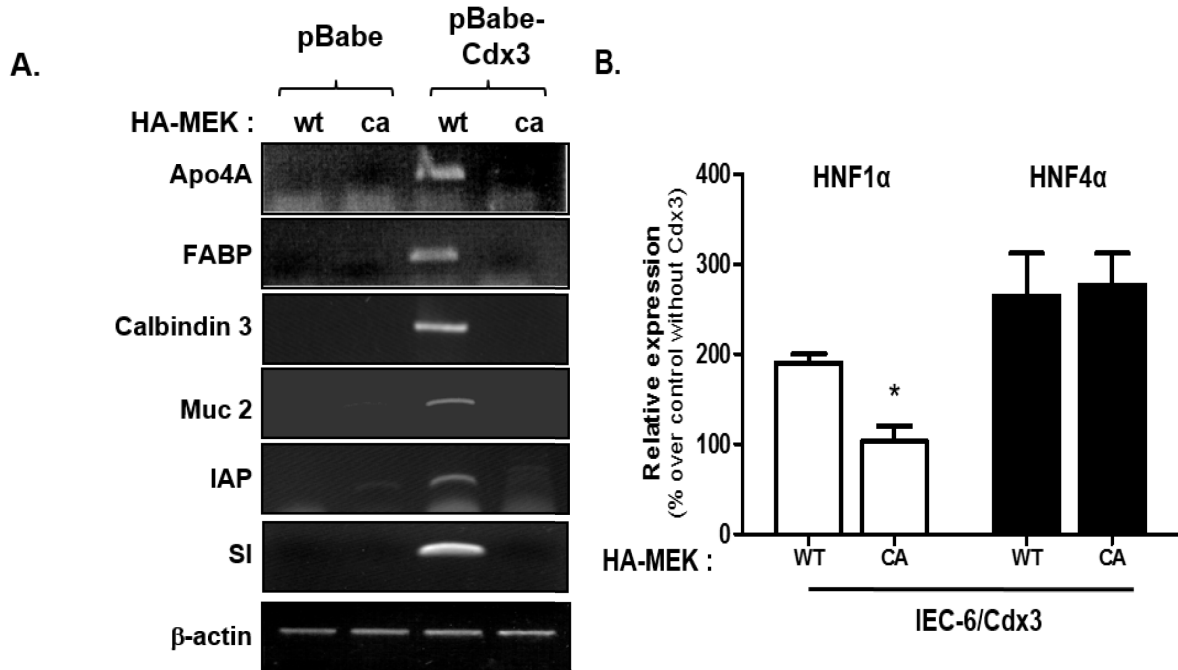


Figure 2. Activated MEK inhibits IEC-6/Cdx3 functional differentiation. IEC-6/pBabe and IEC-6/pBabe-Cdx3 cells stably expressing HA-wtMEK or HA-caMEK were lysed 30 days after confluence and RNA was isolated. **A-** Gene expression of Apo4A, FABP, Calbindin 3, Muc 2, IAP, sucrase-isomaltase (SI) and β -actin was determined by semi-quantitative RT-PCR. RT-PCR shown are representative of four independent experiments. **B-** HNF1 α and HNF4 α expression was evaluated by quantitative real-time PCR. The relative level of each RNA was calculated using the standard curve method and normalized to the corresponding TATA Binding Protein (TBP) RNA level. * Significantly different from IEC-6/pBabe cells at $p < 0.05$ (Student's t test). Results are means of at least three separate experiments.

cells exhibiting the morphological characteristics of differentiated intestinal epithelial cells such as well-organized microvilli at the apical pole and lateral tight junctions, as previously observed with IEC-6/Cdx2 cells (56). Indeed, Fig.3A (panels 1 and 2) shows that wtMEK-expressing IEC-6/Cdx3 polarized (see brackets) and gained a cylindrical shape whereas IEC-6/Cdx3 cells expressing caMEK maintained a rounded appearance after post-confluency. The morphology of the brush border was also markedly altered, as visualized by the strong reduction in microvilli number at the cell apical membrane in IEC-6/Cdx3 cells expressing caMEK (Fig. 3A, panels 3 and 4, see arrows; Fig. 3B). Cell-cell adhesion plays a crucial role in the polarization and differentiation of epithelial cells (40, 61). As shown in Fig.4A, while apical junctions developed in control cells (panel 1 see arrowheads), they were never detectable in caMEK-expressing cells (panel 2). Accordingly,

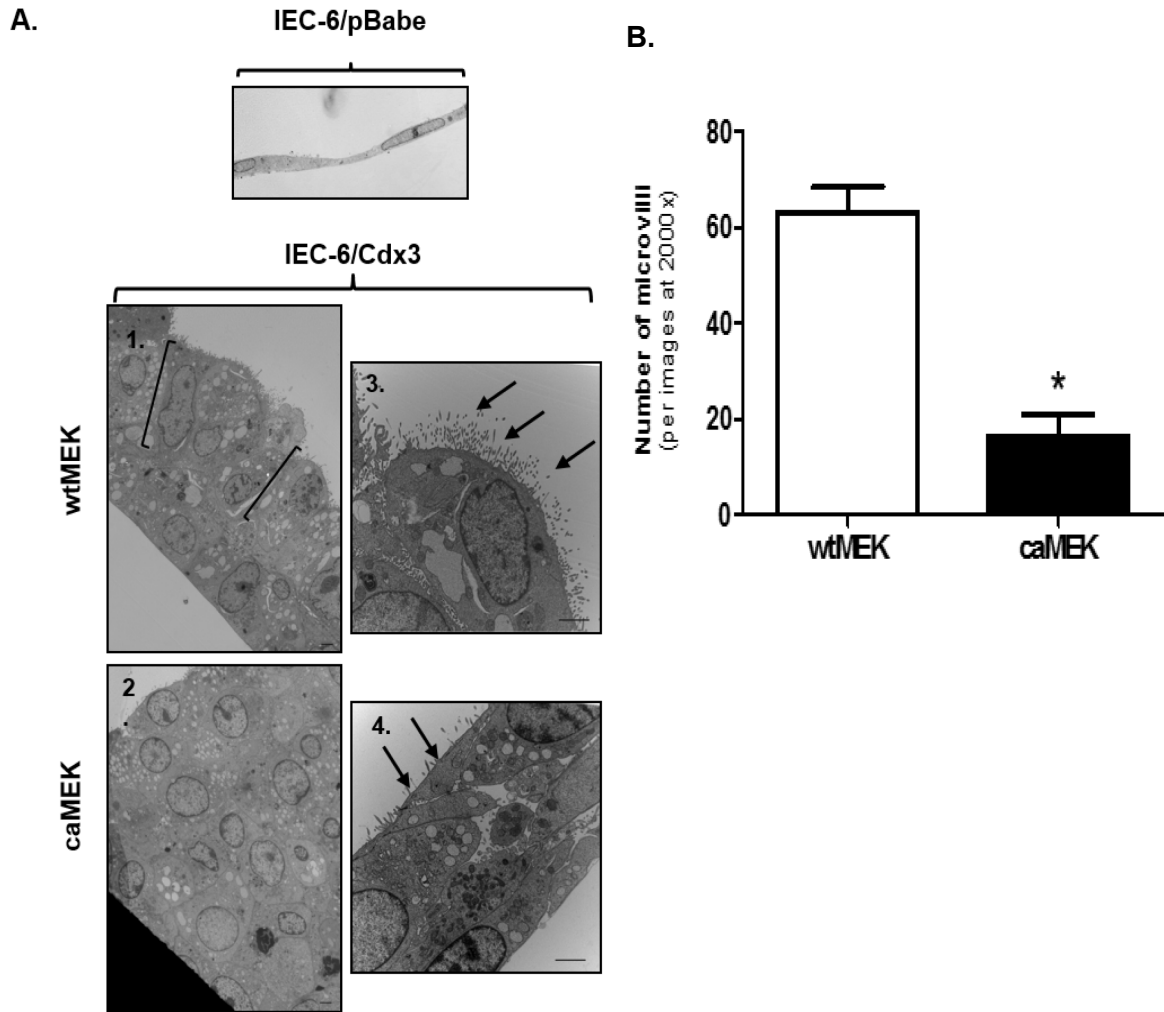


Figure 3. Activated MEK inhibits IEC-6/Cdx3 morphological differentiation. **A-** 30 day-post-confluent IEC-6/pBabe or IEC-6/Cdx3 cells expressing HA-wtMEK or HA-caMEK were fixed in glutaraldehyde and osmium tetroxide and embedded in epoxy for electron microscopy analysis. Bars: 2 μ m (Panels 1-4). Images shown are representative of three independent experiments. **B-** The number of microvilli was counted on 8 pictures from either IEC-6/Cdx3 expressing wtMEK or caMEK at 2000X; * Significantly different from control at $p < 0.001$ (Student's t test). Results are means of two separate experiments.

stable expression of Cdx3 in IEC-6 cells markedly promoted expression of junctional proteins including claudin 2, occludin, ZO-1 and E-cadherin (Fig.4B, lanes 3 versus 1; Fig.4C for quantification). Interestingly, expression of the junctional proteins was significantly reduced when caMEK was expressed in IEC-6/Cdx3 cells (Fig.4B, lane 4). Of note, caMEK expression alone in IEC-6/pBabe cells significantly reduced ZO-1, E-cadherin and occludin basal levels (Fig.4B, lane 2; Fig.4C for quantification). Taken

together, these results indicate that activated MEK interferes with both the morphological and functional differentiation program induced by Cdx3 in IEC-6 cells.

Of note, expression of activated MEK in IEC-6/Cdx3 cells did not alter their proliferative rate at subconfluence in comparison to wtMEK-expressing IEC-6/Cdx3 cells (data not shown). However, after confluency, expression of oncogenic MEK seems to consistently increase proliferation as observed by the higher number of cells present in the multi-layer formed after 30 days of confluency (Fig.3A, panel 2). Such proliferative effect of caMEK in confluent IEC-6 cells was previously reported (10).

Activated MEK negatively regulates Cdx3 transcriptional activity through serine 60 phosphorylation, without affecting its expression, stability or DNA binding capacity.

To further characterize how activated MEK interferes with the Cdx3-activated differentiation program, we next compared, in control wtMEK- or caMEK-expressing IEC-6 cells, the Cdx3 transactivation potential on the human Cdx2/3 regulated sucrase-isomaltase promoter (55). As shown in Fig. 5A, luciferase assays with the pSI-luc construct show that ectopic and transient Cdx3 expression resulted in a strong increase (14-fold induction) of sucrase-isomaltase promoter activity in wtMEK-expressing cells. In contrast, caMEK expression reduced more than 4-fold sucrase-isomaltase promoter activity following Cdx3 expression (graph on the left). Interestingly, luciferase assays with the pLPH-luc construct, also demonstrated that caMEK expression significantly inhibited lactase-phlorizin hydrolase promoter activity following Cdx3 expression (graph on the right).

Of note, activation of the ERK1/2 pathway has been recently shown to promote Cdx2 degradation in colorectal cancer cell lines (37). Cdx3 protein stability was therefore analyzed by Western blot in IEC-6/Cdx3 cells with the use of emetine, an inhibitor of protein synthesis. As shown in Fig.5B, we did not observe significant differences in Cdx3 protein stability between wtMEK- or caMEK-expressing cells. Furthermore, Cdx3 protein subcellular localization was not affected in wtMEK- and caMEK-expressing IEC-6/Cdx3 cells (Fig.5C). These results suggest that activated MEK inhibited Cdx3 transcriptional

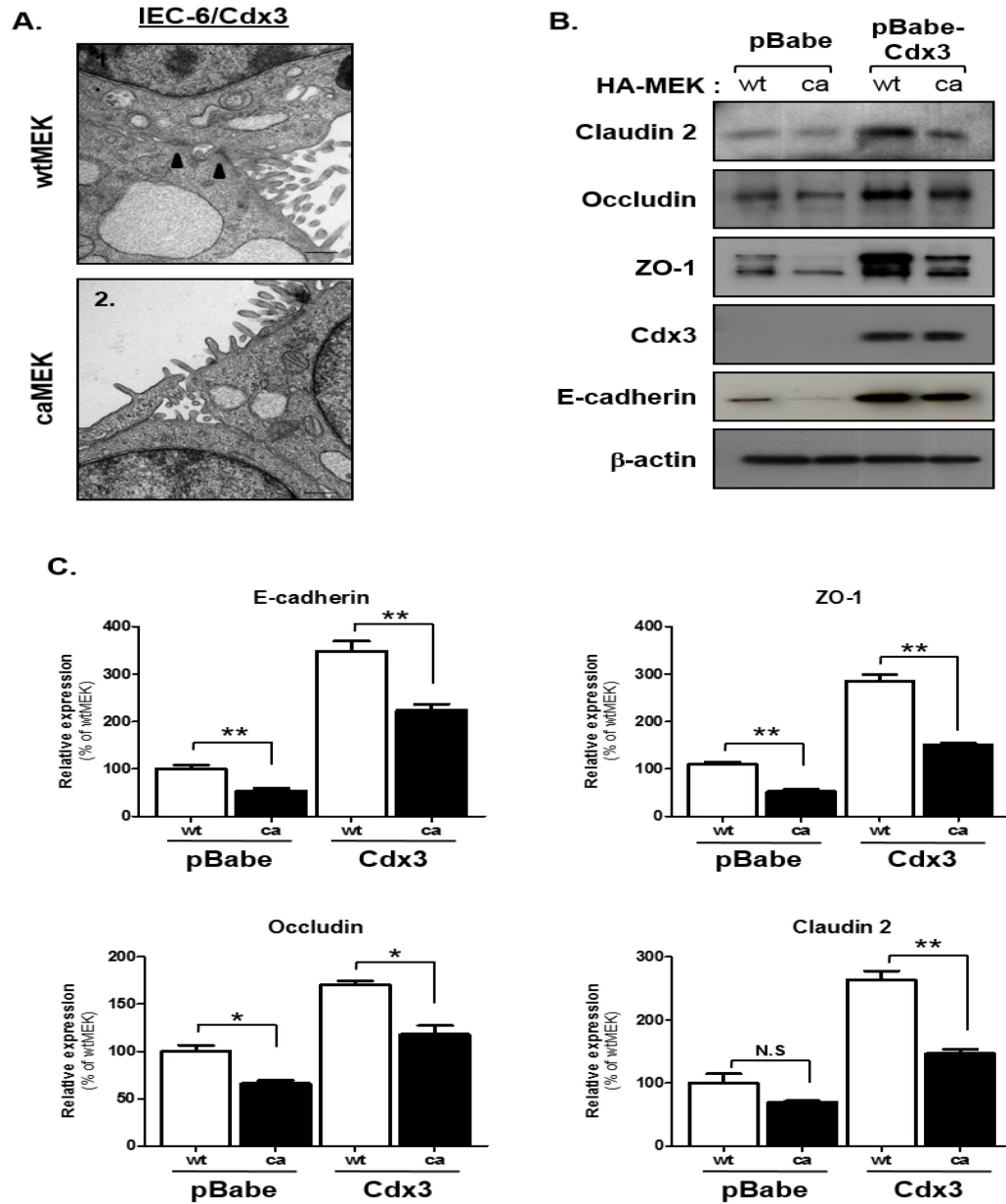


Figure 4. Activated MEK inhibits formation of apical junctions and expression of epithelial junctional proteins in IEC-6/Cdx3. **A-** 30 day-post-confluent IEC-6/Cdx3 cells expressing HA-wtMEK or HA-caMEK were fixed in glutaraldehyde and osmium tetroxide and embedded in epoxy for electron microscopy analysis. Bars: 500 nm (Panels 1-2). Images shown are representative of three independent experiments. **B-** IEC-6/pBabe cells or IEC-6/Cdx3 cells expressing HA-wtMEK (wt) or HA-caMEK (ca) were lysed 30 days after confluence. Equal amounts of proteins separated by 10% SDS-PAGE were analyzed by Western blotting for expression of claudin 2, occludin, ZO-1, Cdx3, E-cadherin and β -actin. Representative experiment is shown. **C-** Same as in B, except that immunoreactive bands from three different independent experiments were semi-quantified. Significantly different from IEC-6/pBabe wtMEK(wt) or IEC-6/Cdx3 wtMEK(wt) cells at $p < 0.05$ (*) or at $p < 0.005$ (**) (Student's t test). Results are means of three separate experiments.

activity in normal intestinal crypt epithelial cells without affecting its stability or localization. It was previously reported that the Cdx2 activation domain is phosphorylated at serine 60 via the ERK/MAPKinase pathway and that S60 phosphorylation decreases Cdx2 transactivation potential (51). We therefore verified Cdx3 S60-specific phosphorylation in our stable IEC-6/Cdx3 cell populations expressing wtMEK or caMEK, by using a phosphospecific antibody directed against a synthetic peptide including amino acids 54-66 of mouse Cdx2 and the phosphorylated serine at position 60 (51). As shown in Fig.5D, Cdx3 protein was markedly phosphorylated on serine 60 in cells expressing activated MEK, correlating with the enhanced ERK1/2 activity.

We next examined whether the high endogenous MEK/ERK activities observed in subconfluent growing Caco-2/15 cells exert an inhibitory effect on sucrase-isomaltase promoter activity. In transiently transfected subconfluent Caco-2/15 cells, sucrase-isomaltase promoter activity was significantly stimulated by more than 18-fold by Cdx3 ectopic expression. Of note, expression of the activated MEK, but not wild-type MEK, dose-dependently reduced the inducing effect of Cdx3 on the sucrase-isomaltase promoter activity (Fig.6A). Conversely, sucrase-isomaltase gene expression was significantly stimulated by more than 1.7-fold above control when endogenous MEK/ERK activities were blocked by the MEK-1/2 inhibitor, PD98059 (Fig.6B). Concomitantly, increasing concentrations of PD98059 reduced Cdx2 phosphorylation on serine 60, without significantly affecting total expression levels (Fig. 6C). Taken together, these data indicate that high ERK1/2 activities in Caco-2/15 cells (1) promote Cdx2/3 phosphorylation on serine 60, therefore leading to negative regulation of Cdx2/3 transcriptional activity and consequently repressing the enterocyte differentiation program.

Finally, to confirm the importance of S60 phosphorylation in transducing the negative effect of activated MEK on Cdx3 transactivation potential, we mutated this serine into alanine. We analyzed the transcriptional potential of the Cdx3 S60A mutant on sucrase-isomaltase promoter activity, with or without wtMEK or caMEK, in subconfluent Caco-2/15 cells. Luciferase assays show that mutation of serine 60 increased significantly the transcriptional activation of the sucrase-isomaltase gene promoter in comparison to

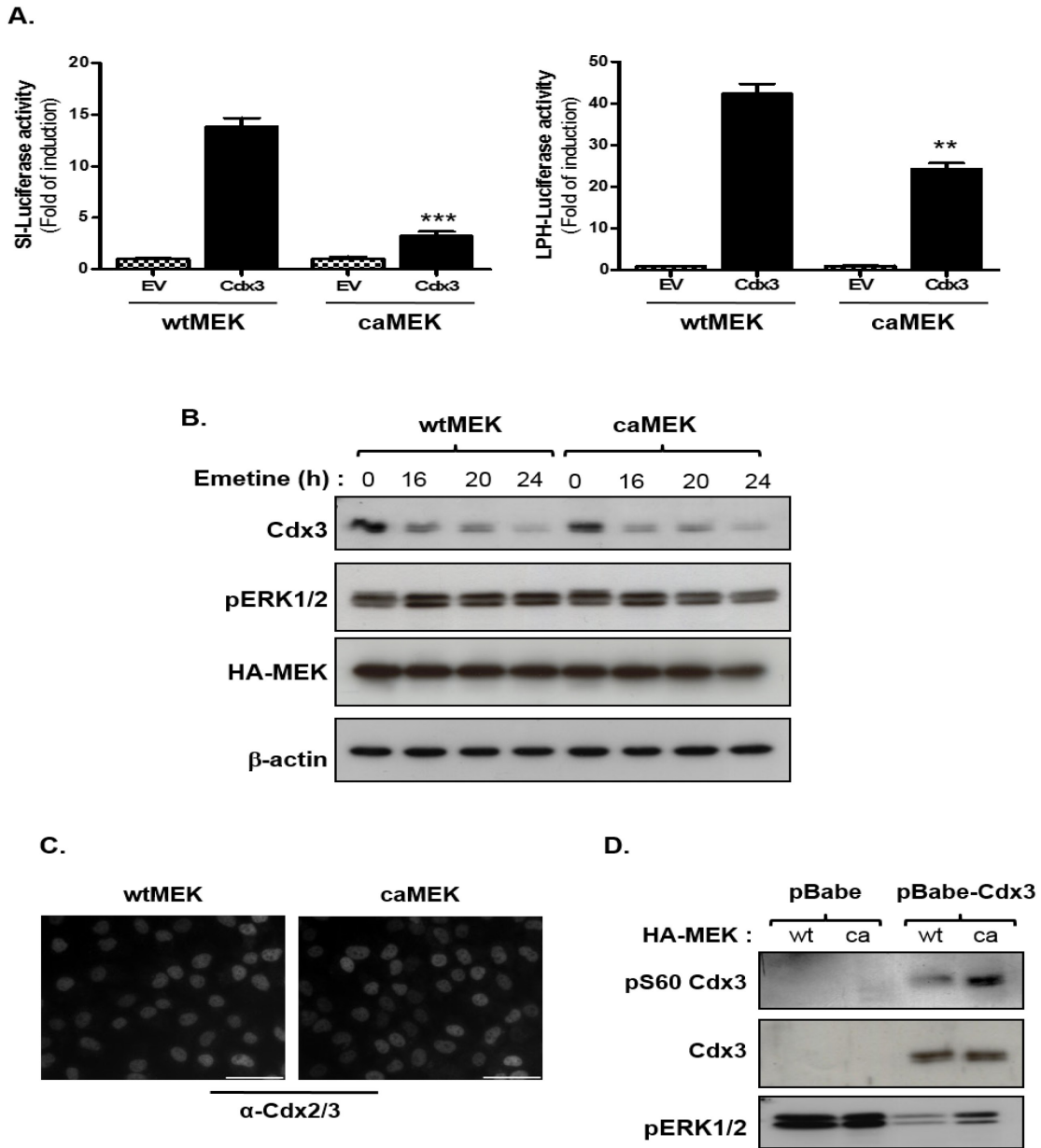


Figure 5. Activated MEK negatively regulates Cdx3 transcriptional activity in IEC-6 cells without affecting its expression or stability. **A-** Subconfluent IEC-6 cells stably expressing HA-wtMEK or HA-caMEK were transiently transfected with 0.1 μ g of the reporter vectors SI-luciferase or LPH-luciferase and 0.2 μ g of the expression vector pBAT alone or containing Cdx3. Two days after transfection, cells were lysed and luciferase activity was measured. Increases in luciferase activity were calculated relative to control levels (cells transfected with empty vector, without Cdx3) set at 1. The pRL-SV40 *Renilla* luciferase vector was used as a control for transfection efficiency. Results are means of at least four separate experiments. ** Significantly different from control at $p < 0.005$; *** Significantly different from control at $p < 0.0005$ (Student's *t*-test). **B-** Subconfluent IEC-6/Cdx3 cells stably expressing HA-wtMEK or HA-caMEK were treated with the protein synthesis inhibitor emetine (10 μ M) for 0, 16, 20, or 24 h and lysed. Cell extracts were

separated by 10% SDS-PAGE, and proteins were analyzed by Western blotting for Cdx3, pERK1/2, HA-wtMEK or HA-caMEK and β -actin expression. Blots shown are representative of three independent experiments. **C-** IEC-6/Cdx3 cells stably expressing HA-wtMEK or HA-caMEK were fixed and analysed by immunofluorescence for Cdx3 expression. Scale bars: 50 μ m. Images shown are representative of three independent experiments. **D-** IEC-6/Cdx3 cells stably expressing HA-wtMEK or HA-caMEK were lysed 30 days after confluence. Equal amounts of protein separated by 10% SDS-PAGE were analyzed by Western blotting for expression of Cdx3, pERK1/2 and S60-phosphorylated Cdx3 (pS60 Cdx3) with specific antibodies. Blots shown are representative of three independent experiments.

wtCdx3, in control wtMEK-expressing cells (Fig 6D). Of note, while activated MEK expression significantly reduced wtCdx3 transactivation, the transcriptional activity of the Cdx3 S60A mutant was not altered. Similar results were found in IEC-6 cells (data not shown). These transcriptional effects of the Cdx3 S60A mutation were not attributable to altered expression, since S60A- and wtCdx3 stabilities were comparable (Fig.6E).

In addition, S60A- and wtCdx3 displayed similar DNA-binding capacities, as assessed by electrophoretic mobility shift experiments (Fig. 6F, lanes 2 and 3). These complexes were completely supershifted (Fig. 6F, lanes 5 and 6; see arrows) when specific Cdx2/3 antibodies were included in the binding reactions. Thus, this confirms that the enhanced transactivation potential of the mutant cannot be attributed to altered DNA-binding affinity. Therefore, these results suggest that phosphorylation of Cdx3 on serine 60 by activated MEK inhibits sucrase-isomaltase gene expression and may also contribute to the inhibition of enterocyte differentiation.

Discussion

Several evidences suggest that the MEK/ERK signalling pathway acts as a negative regulator of enterocyte differentiation and that inhibition of ERK1/2 activities correlates with the induction of the differentiated state. First, activated forms of ERK1/2 are detected in the nucleus of human intestinal undifferentiated crypt cells while barely detectable in differentiated cells of the villi (1). Second, we have shown that ERK1/2 activities dramatically decrease in Caco-2/15 cells during differentiation. Third, Taupin and Podolsky (57) reported decreased ERK1 and ERK2 activities in HT29-18-N2 cells, a subclone of HT29, during differentiation in glucose-free medium. Fourth, ERK-associated kinase

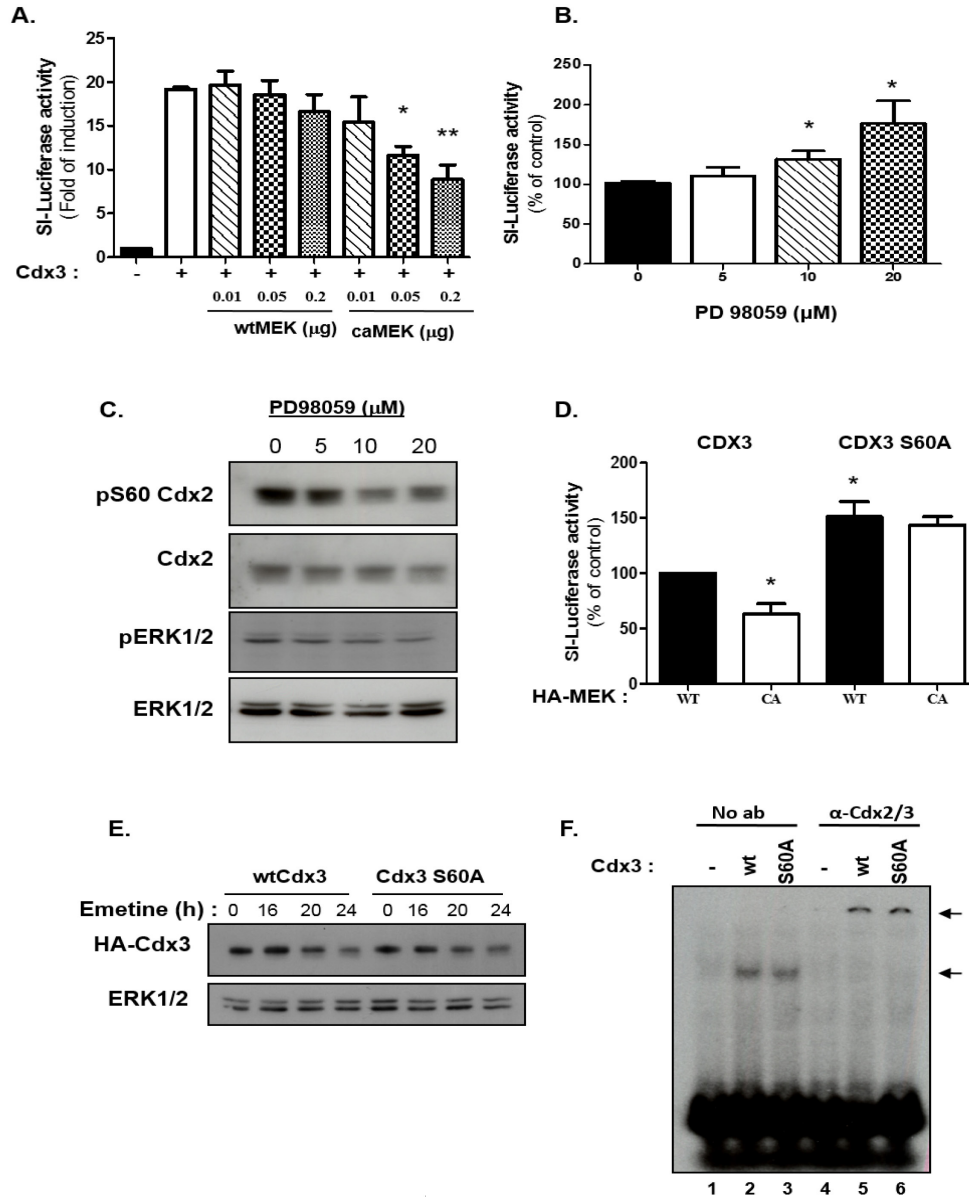


Figure 6. Activated MEK negatively regulates Cdx2/3 transcriptional activity through serine 60 phosphorylation. **A** - Subconfluent Caco-2/15 cells (70%) were transfected with 0.1 μg of the reporter vector SI-luciferase, 0.2 μg of the expression vector pBAT alone or containing Cdx3 and different amounts of wtMEK or caMEK vectors. Two days after transfection, cells were lysed and luciferase activity was measured. The increase in luciferase activity was calculated relative to control levels (cells transfected with pBAT, without Cdx3) of SI-luciferase set at 1. The pRL-SV40 *Renilla* luciferase vector was used as a control for transfection efficiency. Results are means of at least four separate experiments. * Significantly different from control at $p < 0.05$. ** Significantly different from control at $p < 0.01$ (Student's *t*-test). **B**- Subconfluent Caco-2/15 cells (70%) were transfected with 0.1 μg of the reporter vector SI-luciferase, 0.2 μg of the expression vector pBAT containing Cdx3. After 24 h, cells were treated with different concentrations of the MEK inhibitor PD98059 (0, 5, 10, 20 μM) during 24 h, lysed and luciferase activity was

measured. The increase in luciferase activity was calculated relative to control levels (cells treated with DMSO) of SI-luciferase set at 100%. The pRL-SV40 *Renilla* luciferase vector was used as a control for transfection efficiency. * Significantly different from control at $p < 0.05$. Results are means of at least four separate experiments. **C-** Subconfluent growing Caco-2/15 cells were treated with different concentrations of the MEK inhibitor PD98059 (0, 5, 10, 20 μM) during 24 h, lysed and equal amounts of proteins were separated by 10% SDS-PAGE and analyzed by Western blotting for endogenous expression of S60-phosphorylated Cdx2 (pS60 Cdx2), total Cdx2, phosphorylated (pERK1/2) and total ERK1/2. Blots shown are representative of three independent experiments. **D-** Subconfluent Caco-2/15 cells (70%) were transfected with 0.1 μg of the reporter vector SI-luciferase, 0.2 μg of the expression vector containing wtCdx3 or Cdx3 S60A mutant with wtMEK or caMEK-expressing vectors. Two days after transfection, cells were lysed and luciferase activity was measured. The increase in luciferase activity was calculated relative to control levels (cells transfected with pBATCdx3 and wtMEK) of SI-luciferase set at 100%. The pRL-SV40 *Renilla* luciferase vector was used as a control for transfection efficiency. * Significantly different from control at $p < 0.05$. Results are means of at least four separate experiments. **E-** Subconfluent Caco-2/15 cells transiently expressing HA-wtCdx3 or HA-Cdx3 S60A mutant were treated with the protein synthesis inhibitor emetine (10 μM) for 0, 16, 20, or 24 h and lysed. Cell extracts were separated by 10% SDS-PAGE, and proteins were analyzed by Western blotting for HA-Cdx3 and total ERK1/2. Blots shown are representative of three independent experiments. **F-** Binding of nuclear proteins to the SIF1 (Cdx2) elements was assessed in IEC-6 cells expressing empty vector pBAT (lanes 1 and 4) or pBAT encoding wtCdx3 (lanes 2 and 5) or Cdx3 S60A (lanes 3 and 6). Nuclear extracts were prepared and mixed with ^{32}P -labeled double-stranded oligonucleotides. DNA-protein complexes were separated from the free probe on a native polyacrylamide gel and supershifts (lanes 5 and 6; see arrows) were performed using the Cdx2/3 antibodies to confirm specificity of the assay. The results are representative of three independent experiments

activity is inhibited following sodium butyrate-induced Caco-2 cell differentiation (18). Fifth, the expression of DUSP-1, a MAP kinase phosphatase-1 which inactivates the ERKs, is induced in differentiating Caco-2/15 cells (1) and is restricted to the differentiated enterocytes of the villi (14, 46). Taken together, these studies indicating that the MEK/ERK pathway is tightly controlled during enterocyte differentiation, suggest that ERK inhibition may play an important role in the normal intestinal epithelial cell differentiation pathway as cells move along crypt-villus axis.

To verify whether inactivation of the ERK pathway is necessary for induction of differentiation of intestinal epithelial cells, our first strategy was to overexpress a constitutive activated form of MEK (caMEK) in Caco-2/15. We successfully generated stable populations of Caco-2/15 cells expressing wild-type MEK or caMEK. Unfortunately,

expression of caMEK in these cells was not sufficient to prevent ERK inhibition at post-confluency, and therefore did not interfere with the differentiation process. This observation implies that the down-regulation of ERK1/2 phosphorylation in newly post-confluent Caco-2/15 cells results primarily from the induction of downstream phosphatases. Indeed, the dual specificity phosphatases DUSP1 and DUSP6 are induced during Caco-2/15 cell differentiation (1) and therefore represent plausible candidates involved in ERK inactivation.

To circumvent this situation, we have used a simpler model of enterocyte differentiation, namely IEC-6 cells stably expressing the Cdx3 transcription factor. The Cdx2/3 transcription factors, belonging to the mammalian homeobox gene family related to the *Drosophila melanogaster* gene *caudal* (19, 32), induce cell differentiation and polarization of rat immortalized IEC-6 cells (56). DNA microarray analysis (59) and other studies (21, 28, 55) have shown that Cdx2 induces the expression of genes involved in digestion, such as sucrase-isomaltase and lactase, and in cell-cell or cell-substratum interactions, such as LI-cadherin, E-cadherin, the integrin $\beta 4$ subunit, α -actinin, and claudin 2. Thus, the data strengthen the idea that Cdx2 is a major transcription factor triggering intestinal epithelial differentiation (22). We demonstrate herein that expression of activated MEK1 in IEC-6/Cdx3 cells potently blocks Cdx3-dependent differentiation, as demonstrated by the marked reduction in the number of microvilli on the apical surface and the complete lack of induction of general enterocyte marker genes, including ApoA4, FABP, calbindin-3, MUC2, alkaline phosphatase and sucrase-isomaltase. Additionally, activated MEK1 also reduced the inducing effect of Cdx3 on HNF1 α mRNA levels without affecting HNF4 α expression. It has been recently reported that the maintenance of *HNF1 α* and *HNF4 α* expression in the embryonic intestine is directly controlled by Cdx2 (22). Why expression of HNF1 α , but not HNF4 α , is decreased by activated MEK is not clear. One might speculate that transcription factors other than Cdx2 maintain the expression levels of HNF4 α in presence of constitutive MEK/ERK activity. Further experiments are needed to understand the differential regulation of those transcription factors in the context of oncogenic MEK/ERK activity during the differentiation process. Overall, our results are in agreement with those of Taupin and Podolsky who previously reported that long-term MEK

inhibition with PD98059 in HT29-18-N2 colorectal cells induced expression of intestinal trefoil factor, sucrase-isomaltase and Muc2 genes (57). In addition, we showed that elevated ERK1/2 activities in subconfluent proliferative Caco-2/15 cells exert an inhibitory effect on differentiation, since the MEK inhibitor PD98059 significantly increases sucrase-isomaltase transcription. Taken together, these results indicate that Ras oncoprotein and its downstream effectors which include ERK1/2 indeed antagonize enterocyte differentiation.

Aside from demonstrating a negative role for the MEK/ERK signaling in the regulation of the differentiation process, our study also provides some insights into how MEK represses Cdx2/3 function. First, activated MEK negatively regulates Cdx2/3 transcriptional activity without affecting its expression, stability or DNA-binding ability. Our data contrast with those from Krueger and colleagues (37) who reported that expression of the ERK1/2 pathway oncogenic activators *KRAS* or *BRAF* promote Cdx2 protein degradation in DKO4 cells derived from the DLD-1 colorectal cancer cell line. Second, Cdx2/3 proteins are heavily phosphorylated on serine 60 in IEC-6/Cdx3 cells expressing activated MEK, and in subconfluent proliferative Caco-2/15 cells as well. Phosphorylation of Cdx2 on serine 60 has been reported to decrease the transactivation capacity of Cdx2 (51). Accordingly, we found that the mutant Cdx3 S60A had a significantly higher transcriptional activity in comparison to wild-type Cdx3 in cells having elevated ERK1/2 activities. Of note, in contrast to wild-type Cdx3, the transcriptional activity of Cdx3/S60A on sucrase-isomaltase reporter activities was not inhibited by caMEK expression. Thus, our results suggest that activated MEK inhibits sucrase-isomaltase gene expression by phosphorylating Cdx2/3 on serine 60, reducing its transcriptional activity. Interestingly, the distinct localization of the S60-phosphorylated form of Cdx2 in the proliferative compartments of the small and large intestine (51) coincides with the localization of phosphorylated ERK1/2 (1). Further studies are needed to understand whether phosphorylation of serine 60 in the Cdx2/3 activation domain influences the formation of chromatin modifying complexes responsible for regulation of intestine-specific gene expression.

Alternatively, the mechanisms by which activated MEK inhibits IEC-6/Cdx3 differentiation may also relate to the ability of MEK/ERK signalling to modulate the intestinal epithelial

phenotype. Accordingly, our data demonstrate that caMEK expression in control IEC-6/pBabe cells significantly reduced ZO-1, occludin and E-cadherin basal protein levels. This could depend on the known ability of activated MEK to markedly induce expression of Snail1 and Snail2 (42), two transcription factors repressing apico-basal polarity in epithelial cells (6, 41). Thus, in addition to specifically inhibiting the activity of differentiation regulators, such as Cdx2, the MEK/ERK cascade may intrinsically maintain intestinal epithelial cells in a crypt cell phenotype.

Another interesting transcription factor that could be targeted by MEK/ERK signalling is peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) which induces growth arrest and differentiation markers in human colon cancer cells (35). Indeed, PPAR γ transactivation function is attenuated by the MEK/ERK signalling cascade, either by an inhibitory phosphorylation or by modulating PPAR γ 's nucleo-cytoplasmic compartmentalization (13). Current experiments are in progress to identify other transcriptional pathways activated early during intestinal differentiation that could be targeted by the MEK/ERK signalling. Our data thus support an inverse correlation between MEK/ERK signalling intensity and enterocyte differentiation, and attribute a powerful differentiation-inhibitory effect of oncogenic MEK1 in intestinal epithelial cells.

Cdx2 has been reported to negatively regulate the proliferation of intestinal epithelial and colon cancer cells in culture (43, 55). Supporting these *in vitro* observations, *Cdx2*^{+/-} heterozygous mice develop hamartomas or polyps containing heterotopic intestinal tissue in the colon (8). The *Cdx2*^{+/-} mutation markedly increases the colonic polyp number in *Apc*^{+/-} mice (3), and accelerates colonic tumorigenesis induced by azoxymethane treatment (9). Moreover, in mice, human and rat colon cancer cell lines, reduced levels of Cdx2 stimulate G1-S cell-cycle progression and increase chromosomal instability (3). This suggests that reduced levels of Cdx2, and consequently, its reduced transcriptional activity, should accelerate colonic tumorigenesis. However, the mechanism has been unknown, and the target genes that can suppress tumorigenesis unidentified. Intriguingly, Aoki et al. recently reported a nontranscriptional function of Cdx2 in tumor suppression mediated by p27^{Kip1} stabilization (2). Taken together, these results suggest that Cdx2 can be an important tumor

suppressor in colorectal carcinogenesis. However, while some studies reported that expression of Cdx2 mRNA and protein is reduced (29, 30) or lost (20, 44, 45, 48) in human colorectal tumors, others studies did not show any reduction in the expression of Cdx2 in tumors, as compared with normal mucosa (34, 62-64). Additionally, to our knowledge, no study has specifically analyzed the transcriptional activity of Cdx2 in colorectal cancer. Since KRAS is the most frequently mutated oncogene in colorectal cancer, our results suggest that this oncoprotein and its downstream effectors which include MEK and ERK kinases antagonize Cdx2 transcriptional activity and differentiation during colorectal carcinogenesis. Regarding intestinal bowel diseases, there is increasing evidences that Cdx2 is a downstream target of key pro-inflammatory mediators and signalling pathways involved in the inflammatory cascade (16) and a decreased Cdx2 expression in inflamed cells in ulcerative colitis has been reported (54). An intact intestinal epithelial tight junction barrier is crucial in providing a barrier function against translocation of bacteria and toxic agents but also for the immune system homeostasis. By positively regulating *E-cadherin*, *CLDN2* and *MUC2* genes, Cdx2 may play an essential role in the control of intestinal epithelial barrier function. Interestingly, we showed herein that constitutive activation of MEK/ERK pathway represses Cdx2 transactivation activity as well as *MUC2* and *CLDN2* expression in IEC-6 cells. Therefore, it is obvious that a proper regulation of not only Cdx2 expression but also transcriptional activity should be crucial for maintaining a well polarized and differentiated intestinal epithelium. Therefore, future work should be done to fully elucidate how Cdx2 transcriptional activity is altered and could contribute to the pathogenesis of intestinal tumorigenesis and inflammation.

Acknowledgements

The authors thank Anne Vézina for technical assistance. This research was supported by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) MT-14405 (to N.R.). N.R is a recipient of a Canadian Research Chair in Signaling and Digestive Physiopathology. M.J.B. and F.B are scholars from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec. E.L. is a recipient of a doctoral fellowship from Fonds de la Recherche en Santé du Québec. N.R., F.B., M.J.B. and C.A. are members of the FRSQ-funded “Centre de Recherche Clinique Étienne LeBel.

Material and methods

Cell culture

Rat intestinal epithelial cells IEC-6 are normal but immortalized cells isolated from newborn rat intestinal crypts and have been highly used for growth and transformation studies. These cells are not transformed, they need to be cultured in presence of 5% fetal bovine serum (FBS) to proliferate, they stop growing when reaching confluency and they exhibit epithelial morphology (52). IEC-6/pBabepuro and IEC-6/Cdx3 were generated after viral infection of a retroviral vector pBabepuro, or a pBabepuro Cdx3-expressing vector, and puromycin selection, as done before (24). These cell populations were maintained in DMEM supplemented with 4.5 g/l D-glucose, 25 mM HEPES and 5% FBS, under an atmosphere of 5% CO₂ at 37°C. The human colon adenocarcinoma cell line Caco-2/15 (A. Quaroni, Cornell University, Ithaca, NY, USA) was cultured in DMEM supplemented with 4.5 g/l D-glucose, 25 mM HEPES and 10% FBS (1, 17). This cell line provides a well characterized model for the study of gut epithelial differentiation because they undergo confluence-dependent differentiation to a small-bowel like phenotype with microvilli and tight junction formation, in addition to expression of several brush border enzymes, including sucrase-isomaltase (17, 38, 60). Retroviral infections of both cell lines, IEC-6 and Caco-2/15 cells, were always done on low passage cells (P18 for IEC-6 and P14 for Caco-2/15). In some experiments, cells were treated with or without the MEK inhibitor PD98059 (Calbiochem-Novabiochem Corp., San Diego, CA) or the translation inhibitor emetine (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada).

Expression vectors and reporter constructs

The hamster Cdx3 expression vector was provided by Dr M.S. German (University of California, San Francisco, CA, USA) (25). The full-length Cdx3 cDNA was subcloned into the pBAT expression vector in frame with the HA epitope, by PCR using an oligonucleotide containing the sequence encoding the HA epitope (11). The HA-Cdx3 (S60A) mutant was generated by overlap extension PCR with the forward primer: 5'-GAC AGC GCT CAG GCG CCA GGG CCA-3' and the reverse primer: 5'-TGG CCC TGG CGC CTG AGC GCT GTC-3' to change the serine 60 for alanine. The pRL-SV40 *Renilla* luciferase reporter

vector was from Promega (Nepean, ON, Canada). The sucrase-isomaltase reporter construct (SI-luc) contains the human sucrase-isomaltase promoter (−201 to + 139) cloned upstream of the luciferase gene of the pGL2 reporter construct (Dr P.G. Traber, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA, USA). The lactase-phlorizin hydrolase reporter construct (LPH-luc) contains the human lactase-phlorizin promoter cloned upstream of the luciferase gene of the pGL2 reporter construct (58). Expression vectors for HA-tagged wild-type MEK1 (wtMEK) and constitutively active MEK1 mutant (caMEK), with a conversion of S218 and S222 Raf1-dependent regulatory phosphorylation sites to aspartic residues (12), were provided by Dr J. Pouyssegur (Université de Nice, Nice, France). The HA-wtMEK and HA-caMEK constructs were subcloned into the retroviral expression vector pLXIN (Clontech), as described before (10).

Virus production and retroviral infections

wtMEK, caMEK and empty pLXIN vectors were co-transfected in HEK293T cells with helper Vpack DNAs (Stratagene, La Jolla, CA), by lipofection (Lipofectamine 2000, Invitrogen, Burlington, ON, Canada). Cell culture supernatants were collected 48 h after transfection and filtered through Millex-HA filters (Millipore Corporation, Bedford, MA). Subconfluent Caco-2/15 cells, IEC/pBabepuro and IEC-6/Cdx3 cell populations were infected with the viral suspension containing 4 µg/ml of polybrene (Hexadimethrine bromide H-9268, Sigma-Aldrich) for 1 h at 37°C. The medium was then changed and selection for G418 resistance was applied 24 h later for 5-10 days in order to obtain stable populations. All experiments shown were performed within 5-6 passages following the 5-10 days of selection with G418.

Protein expression and immunoblotting

Cells were lysed in sodium dodecyl sulfate (SDS) sample buffer (62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 2.3% SDS, 10% glycerol, 5% β-mercaptoethanol, 0.005% bromophenol blue). Proteins (10-50 µg) from whole cell lysates were separated by SDS-PAGE in 7.5 or 10% gels. Proteins were detected immunologically following electrotransfer onto nitrocellulose membranes (Amersham-Pharmacia Biotech, Baie d'Urfé, QC, Canada). Protein and molecular weight markers (BioRad, Mississauga, ON, Canada) were revealed by Ponceau

Red staining. Membranes were blocked in PBS containing 5% powdered milk and 0.05% Tween-20 for 1 h at 25°C. Membranes were then incubated overnight at 4°C with primary antibodies in blocking solution, then with horseradish peroxidase or alkaline phosphatase-conjugated goat anti-mouse or anti-rabbit (1:10000) IgG for 1 h. Phospho-ERK1/2 and total ERK1/2 detection were done on the same blots, using horseradish peroxidase and alkaline phosphatase-conjugated anti-mouse or anti-rabbit during the same hybridation. pS60-Cdx3 and total Cdx3 were reprobates of the same blot after stripping the membrane in stripping buffer (100 mM 2-mercaptoethanol, 2% sodium dodecyl sulphate, 62.5 mM Tris-HCl pH 6.6) at 50°C, during 30 min. Blots were visualized using the Amersham ECL system (Amersham-Pharmacia Biotech) or Millipore Immobilon AP substrate (Millipore Corporation). Protein concentrations were measured using a modified Lowry procedure with bovine serum albumin as standard (49). Antibodies against total ERK and HA epitope were from Santa Cruz Biotechnologies (Santa Cruz, CA). Antibodies recognizing phosphorylated ERK1/2 were obtained from Cell Signaling (Danvers, MA). Monoclonal antibody HSI-14 against sucrase-isomaltase was provided by Dr Andrea Quaroni (Cornell University, Ithaca, NY). Antibodies against E-cadherin and pRb were from BD Pharmingen (Mississauga, ON, Canada). The occludin, claudin 2 and the ZO-1 antibodies were all from Zymed Laboratories (Invitrogen). Antibodies recognizing β -actin were purchased from Chemicon International (Billerica, MA). Antibodies against Cdx2/3 proteins were described previously (11). Antibodies recognizing the Cdx2 phosphorylated serine 60 was given by Dr Edmond H Rings (University of Groningen, Groningen, The Netherlands) (51).

RNA extraction and RT-PCR analysis

Total RNA was isolated with the RNeasy mini kit (Qiagen, Canada). RT was performed using AMV-RT (Roche Diagnostics) and PCR reactions were done with Taq DNA polymerase (Qiagen, Canada), according to the manufacturer's instructions. DNA amplification products were analyzed by gel electrophoresis on a 2% agarose gel stained with ethidium bromide. HNF1 α and HNF4 α gene expression was assessed by real-time PCR analysis (QPCR) with a LightCycler apparatus (Roche Diagnostics). Experiments were run and analyzed with the LightCycler software 4.0, according to manufacturer's recommendations. Synthesis of double stranded DNA during the PCR cycles was monitored

with SYBR Green I (QuantiTect SYBR Green PCR Kit; Qiagen). All samples were run in triplicate. Target expression was quantified relatively to TATA-Binding Protein (TBP) expression. A standard calibration curve was prepared for each gene by using serial dilutions of the calibrator sample and crossing point values were plotted vs. the log of the relative concentration of each dilution. This standard curve was used to correct for differences in PCR efficiencies. Oligonucleotide primers used for DNA amplification were synthesized by Invitrogen. Primer sequences are available upon request.

Electron Microscopy

Cell cultures were rinsed with PBS, pre-fixed for 15 min with a 1:1 mixture of culture medium (DMEM) and freshly prepared 2.8% glutaraldehyde in cacodylate buffer (0.1 M cacodylate-7.5% sucrose), then fixed for 30 min with 2.8% glutaraldehyde at room temperature. After two rinses, specimens were post-fixed for 60 min with 2% osmium tetroxide in cacodylate buffer. Cells were then dehydrated with increasing ethanol concentrations (40%, 70%, 90%, 95%, 100%), 3 times each, then covered twice for 3 hours with a thin layer of Araldite 502 resin (for ethanol substitution). Finally, the resin was allowed to polymerize at 60°C for 48 h. Specimens were detached from the plastic vessels, inverted in embedding molds, covered with Araldite 502 and re-incubated at 60°C for 48 h. Thin sections were prepared using an ultramicrotome, contrasted with lead citrate and uranyl acetate, and observed in a blind fashion on a JEOL 100 CX transmission electron microscope. All reagents were purchased from Electron Microscopy Sciences (Cedarlane, Hornby, ON, Canada).

Immunofluorescence microscopy of cultured cells

Immunofluorescence of cells grown on sterile glass coverslips were performed as previously described (42). Goat anti-rabbit AlexaFluoro488 FITC-labeled secondary antibodies were from Molecular Probes (Invitrogen). Negative controls (no primary antibody) were included in all experiments.

Transient transfections and luciferase assays

Caco-2/15 and IEC-6 cells, at 50% to 70% of confluence, were seeded in 24-well plates for

24 h. The next day, one hour before transfection, medium was removed, and cells were washed twice with warm Opti-MEM. 500 μ l of Opti-MEM media (Invitrogen), free of antibiotic and antimycotic, was then added to each well. Cells were co-transfected with Lipofectine (Caco-2/15) or Lipofectamine 2000 (IEC-6), 0.1 μ g of the sucrase-isomaltase promoter-luciferase construct pSI-luc or pLPH-luc and the relevant expression vectors containing either Cdx3, wtMEK or caMEK. The pRL-SV40 *Renilla* luciferase vector was used as a control for transfection efficiency. Two days after transfection, luciferase activity was measured with the dual luciferase assay kit according to the Promega protocol.

Electrophoretic mobility shift assays

IEC-6 cells that stably expressing pBAT (empty vector) or pBAT encoding wtCdx3 or Cdx3 S60A mutant were generated following retroviral infection. Nuclear extracts were prepared and electrophoretic mobility shift assays were performed as described previously (24). Samples were electrophoresed in a 4% polyacrylamide gel containing 0.5% Tris-borate buffer and 2% glycerol. The following human sucrase-isomaltase promoter SIF1 Cdx2 DNA-binding site (-58 to -33) was used: 5'-AGGGTGCAATAAACTTTATGAGTAG-3'. Supershift assays were performed by using specific antibodies against Cdx2/3 (11).

Statistical analysis

Representative Western blot and RT-PCR data of three independent experiments are shown. Densitometric analyses of each blot were performed using ImageJ software. Luciferase results are the mean \pm S.E of at least four independent experiments performed in quadruplicate. Results were analyzed by the Student's t test.

References

1. Aliaga JC, Deschenes C, Beaulieu JF, Calvo EL, Rivard N. Requirement of the MAP kinase cascade for cell cycle progression and differentiation of human intestinal cells. *Am.J.Physiol.* 277: G631-G641, 1999.
2. Aoki K, Kakizaki F, Sakashita H, Manabe T, Aoki M, Taketo MM. Suppression of colonic polyposis by homeoprotein CDX2 through its nontranscriptional function that stabilizes p27Kip1. *Cancer Res.* 71: 593-602, 2011.
3. Aoki K, Tamai Y, Horiike S, Oshima M, Taketo MM. Colonic polyposis caused by mTOR-mediated chromosomal instability in Apc+/Delta716 Cdx2+/- compound mutant mice. *Nat.Genet.* 35: 323-330, 2003.
4. Babeu JP, Darsigny M, Lussier CR, Boudreau F. Hepatocyte nuclear factor 4alpha contributes to an intestinal epithelial phenotype in vitro and plays a partial role in mouse intestinal epithelium differentiation. *Am.J.Physiol.Gastrointest.Liver Physiol.* 297: G124-G134, 2009.
5. Baron-Delage S, Mahraoui L, Cadoret A, Veissiere D, Taillemite JL, Chastre E, Gespach C, Zweibaum A, Capeau J, Brot-Laroche E, Cherqui G. Deregulation of hexose transporter expression in Caco-2 cells by ras and polyoma middle T oncogenes. *Am.J.Physiol.* 270: G314-G323, 1996.
6. Bates RC, Mercurio AM. The epithelial-mesenchymal transition (EMT) and colorectal cancer progression. *Cancer.Biol.Ther.* 4: 365-370, 2005.
7. Beaulieu JF, Quaroni A. Clonal analysis of sucrase-isomaltase expression in the human colon adenocarcinoma Caco-2 cells. *Biochem. J.* 280: 599-608, 1991.
8. Beck F, Chawengsaksophak K, Waring P, Playford RJ, Furness JB. Reprogramming of intestinal differentiation and intercalary regeneration in Cdx2 mutant mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 96: 7318-7323, 1999.
9. Bonhomme C, Duluc I, Martin E, Chawengsaksophak K, Chenard MP, Keding M, Beck F, Freund JN, Domon-Dell C. 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, 2003.
10. Boucher MJ, Jean D, Vezina A, Rivard N. Dual role of MEK/ERK signaling in senescence and transformation of intestinal epithelial cells. *Am.J.Physiol.Gastrointest.Liver Physiol.* 286: G736-G746, 2004.
11. Boulanger J, Vezina A, Mongrain S, Boudreau F, Perreault N, Auclair BA, Laine J, Asselin C, Rivard N. Cdk2-dependent phosphorylation of homeobox transcription factor CDX2 regulates its nuclear translocation and proteasome-mediated degradation in human intestinal epithelial cells. *J.Biol.Chem.* 280: 18095-18107, 2005.
12. Brunet A, Pages G, Pouyssegur J. Constitutively active mutants of MAP kinase kinase (MEK1) induce growth factor-relaxation and oncogenicity when expressed in fibroblasts. *Oncogene* 9: 3379-3387, 1994.
13. Burgermeister E, Seger R. MAPK kinases as nucleo-cytoplasmic shuttles for PPARgamma. *Cell.Cycle* 6: 1539-1548, 2007.

14. Carrasco D, Bravo R. Expression of the nontransmembrane tyrosine phosphatase gene *erp* during mouse organogenesis. *Cell Growth Differ.* 4: 849-859, 1993.
15. Chiu T, Wu SS, Santiskulvong C, Tangkijvanich P, Yee HF, Rozengurt E. Vasopressin-mediated mitogenic signaling in intestinal epithelial cells. *Am.J.Physiol.Cell.Physiol.* 282: C434-C450, 2002.
16. Coskun M, Troelsen JT, Nielsen OH. The role of CDX2 in intestinal homeostasis and inflammation. *Biochim.Biophys.Acta* 1812: 283-289, 2011.
17. Deschenes C, Vezina A, Beaulieu JF, Rivard N. Role of p27(Kip1) in human intestinal cell differentiation. *Gastroenterology* 120: 423-438, 2001.
18. Ding Q, Wang Q, Evers BM. Alterations of MAPK activities associated with intestinal cell differentiation. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 284: 282-288, 2001.
19. Duprey P, Chowdhury K, Dressler GR, Balling R, Simon D, Guenet JL, Gruss P. A mouse gene homologous to the *Drosophila* gene *caudal* is expressed in epithelial cells from the embryonic intestine. *Genes Dev.* 2: 1647-1654, 1988.
20. Ee HC, Erler T, Bhathal PS, Young GP, James RJ. Cdx-2 homeodomain protein expression in human and rat colorectal adenoma and carcinoma. *Am.J.Pathol.* 147: 586-592, 1995.
21. Fang R, Santiago NA, Olds LC, Sibley E. The homeodomain protein Cdx2 regulates lactase gene promoter activity during enterocyte differentiation. *Gastroenterology* 118: 115-127, 2000.
22. Gao N, White P, Kaestner KH. Establishment of intestinal identity and epithelial-mesenchymal signaling by Cdx2. *Dev.Cell.* 16: 588-599, 2009.
23. Garrison WD, Battle MA, Yang C, Kaestner KH, Sladek FM, Duncan SA. Hepatocyte nuclear factor 4alpha is essential for embryonic development of the mouse colon. *Gastroenterology* 130: 1207-1220, 2006.
24. Gendron FP, Mongrain S, Laprise P, McMahon S, Dubois CM, Blais M, Asselin C, Rivard N. The CDX2 transcription factor regulates furin expression during intestinal epithelial cell differentiation. *Am.J.Physiol.Gastrointest.Liver Physiol.* 290: 2: G310-G318, 2006.
25. German MS, Wang J, Chadwick RB, Rutter WJ. Synergistic activation of the insulin gene by a LIM-homeo domain protein and a basic helix-loop-helix protein: building a functional insulin minienhancer complex. *Genes Dev.* 6: 2165-2176, 1992.
26. Gespach C. Crosstalk between the cell cycle regulator Cdk2 and the Cdx2 tumor suppressor at the proliferation-differentiation interface. *Oncogene* 24: 7953-7954, 2005.
27. Gross I, Lhermitte B, Domon-Dell C, Duluc I, Martin E, Gaiddon C, Keding M, Freund JN. Phosphorylation of the homeotic tumor suppressor Cdx2 mediates its ubiquitin-dependent proteasome degradation. *Oncogene* 24: 7955-7963, 2005.
28. Guo RJ, Suh ER, Lynch JP. The role of Cdx proteins in intestinal development and cancer. *Cancer.Biol.Ther.* 3: 593-601, 2004.
29. Hinoi T, Loda M, Fearon ER. Silencing of CDX2 expression in colon cancer via a dominant repression pathway. *J.Biol.Chem.* 278: 44608-44616, 2003.

30. Hinoi T, Tani M, Lucas PC, Caca K, Dunn RL, Macri E, Loda M, Appelman HD, Cho KR, Fearon ER. Loss of CDX2 expression and microsatellite instability are prominent features of large cell minimally differentiated carcinomas of the colon. *Am.J.Pathol.* 159: 2239-2248, 2001.
31. James R, Erler T, Kazenwadel J. Structure of the murine homeobox gene *cdx-2*. Expression in embryonic and adult intestinal epithelium. *J.Biol.Chem.* 269: 15229-15237, 1994.
32. James R, Kazenwadel J. Homeobox gene expression in the intestinal epithelium of adult mice. *J.Biol.Chem.* 266: 3246-3251, 1991.
33. Jasleen J, Shimoda N, Shen ER, Tavakkolizadeh A, Whang EE, Jacobs DO, Zinner MJ, Ashley SW. Signaling mechanisms of glucagon-like peptide 2-induced intestinal epithelial cell proliferation. *J.Surg.Res.* 90: 13-18, 2000.
34. Kaimaktchiev V, Terracciano L, Tornillo L, Spichtin H, Stoios D, Bundi M, Korcheva V, Mirlacher M, Loda M, Sauter G, Corless CL. The homeobox intestinal differentiation factor CDX2 is selectively expressed in gastrointestinal adenocarcinomas. *Mod.Pathol.* 17: 1392-1399, 2004.
35. Karam SM. Lineage commitment and maturation of epithelial cells in the gut. *Front.Biosci.* 4: D286-98, 1999.
36. Karim FD, Rubin GM. PTP-ER, a novel tyrosine phosphatase, functions downstream of Ras1 to downregulate MAP kinase during Drosophila eye development. *Mol. Cell* 3: 741-750, 1999.
37. Krueger F, Madeja Z, Hemberger M, McMahon M, Cook SJ, Gaunt SJ. Down-regulation of Cdx2 in colorectal carcinoma cells by the Raf-MEK-ERK 1/2 pathway. *Cell.Signal.* 21: 1846-1856, 2009.
38. Laprise P, Chailier P, Houde M, Beaulieu JF, Boucher MJ, Rivard N. Phosphatidylinositol 3-kinase controls human intestinal epithelial cell differentiation by promoting adherens junction assembly and p38 MAPK activation. *J.Biol.Chem.* 277: 8226-8234, 2002.
39. Laprise P, Langlois MJ, Boucher MJ, Jobin C, Rivard N. Down-regulation of MEK/ERK signaling by E-cadherin-dependent PI3K/Akt pathway in differentiating intestinal epithelial cells. *J.Cell.Physiol.* 199: 32-39, 2004.
40. Larue L, Antos C, Butz S, Huber O, Delmas V, Dominis M, Kemler R. A role for cadherins in tissue formation. *Development* 122: 3185-3194, 1996.
41. Lee JM, Dedhar S, Kalluri R, Thompson EW. The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. *J.Cell Biol.* 172: 973-981, 2006.
42. Lemieux E, Bergeron S, Durand V, Asselin C, Saucier C, Rivard N. Constitutively active MEK1 is sufficient to induce epithelial-to-mesenchymal transition in intestinal epithelial cells and to promote tumor invasion and metastasis. *Int.J.Cancer* 125: 1575-1586, 2009.

43. Lorentz O, Duluc I, Arcangelis AD, Simon-Assmann P, Kedinger M, Freund JN. Key role of the Cdx2 homeobox gene in extracellular matrix-mediated intestinal cell differentiation. *J.Cell Biol.* 139: 1553-1565, 1997.
44. Mallo GV, Rechreche H, Frigerio JM, Rocha D, Zweibaum A, Lacasa M, Jordan BR, Dusetti NJ, Dagorn JC, Iovanna JL. Molecular cloning, sequencing and expression of the mRNA encoding human Cdx1 and Cdx2 homeobox. Down-regulation of Cdx1 and Cdx2 mRNA expression during colorectal carcinogenesis. *Int.J.Cancer* 74: 35-44, 1997.
45. Mallo GV, Soubeyran P, Lissitzky JC, Andre F, Farnarier C, Marvaldi J, Dagorn JC, Iovanna JL. Expression of the Cdx1 and Cdx2 homeotic genes leads to reduced malignancy in colon cancer-derived cells. *J.Biol.Chem.* 273: 14030-14036, 1998.
46. Mamajiwalla SN, Burgess DR. Differential regulation of the activity of the 42 kD mitogen activated protein kinase (p42mapk) during enterocyte differentiation in vivo. *Oncogene* 11: 377-386, 1995.
47. Martin MG, Wang J, Solorzano-Vargas RS, Lam JT, Turk E, Wright EM. Regulation of the human Na(+)-glucose cotransporter gene, SGLT1, by HNF-1 and Sp1. *Am.J.Physiol.Gastrointest.Liver Physiol.* 278: G591-G603, 2000.
48. Okon K, Zazula M, Rudzki Z, Papla B, Osuch C, Stachura J. CDX-2 expression is reduced in colorectal carcinomas with solid growth pattern and proximal location, but is largely independent of MSI status. *Pol.J.Pathol.* 55: 9-14, 2004.
49. Peterson GL. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal.Biochem.* 83: 346-356, 1977.
50. Rhoads JM, Argenzio RA, Chen W, Rippe RA, Westwick JK, Cox AD, Berschneider HM, Brenner DA. L-glutamine stimulates intestinal cell proliferation and activates mitogen-activated protein kinases. *Am.J.Physiol.* 272: G943-G953, 1997.
51. Rings EH, Boudreau F, Taylor JK, Moffett J, Suh ER, Traber PG. Phosphorylation of the serine 60 residue within the Cdx2 activation domain mediates its transactivation capacity. *Gastroenterology* 121: 1437-1450, 2001.
52. Rivard N, Boucher MJ, Asselin C, L'Allemain G. MAP kinase cascade is required for p27 downregulation and S phase entry in fibroblasts and epithelial cells. *Am.J.Physiol.* 277: C652-C664, 1999.
53. Sancho E, Batlle E, Clevers H. Live and let die in the intestinal epithelium. *Curr.Opin.Cell Biol.* 15: 763-770, 2003.
54. Sipos F, Muzes G, Valcz G, Galamb O, Toth K, Leiszter K, Krenacs T, Tulassay Z, Molnar B. Regeneration associated growth factor receptor and epithelial marker expression in lymphoid aggregates of ulcerative colitis. *Scand.J.Gastroenterol.* 45: 440-448, 2010.
55. Suh E, Chen L, Taylor J, Traber PG. A homeodomain protein related to caudal regulates intestine-specific gene transcription. *Mol.Cell.Biol.* 14: 7340-7351, 1994.
56. Suh E, Traber PG. An intestine-specific homeobox gene regulates proliferation and differentiation. *Mol.Cell.Biol.* 16: 619-625, 1996.
57. Taupin D, Podolsky DK. Mitogen-activated protein kinase activation regulates intestinal epithelial differentiation. *Gastroenterology* 116: 1072-1080, 1999.

58. Troelsen JT, Mitchelmore C, Spodsberg N, Jensen AM, Noren O, Sjostrom H. Regulation of lactase-phlorizin hydrolase gene expression by the caudal-related homeodomain protein Cdx-2. *Biochem.J.* 322: 833-838, 1997.
59. Uesaka T, Kageyama N, Watanabe H. Identifying target genes regulated downstream of Cdx2 by microarray analysis. *J.Mol.Biol.* 337: 647-660, 2004.
60. Vachon PH, Beaulieu JF. Transient mosaic patterns of morphological and functional differentiation in the Caco-2 cell line. *Gastroenterology* 103: 414-423, 1992.
61. Vleminckx K, Kemler R. Cadherins and tissue formation: integrating adhesion and signaling. *Bioessays* 21: 211-220, 1999.
62. Werling RW, Yaziji H, Bacchi CE, Gown AM. CDX2, a highly sensitive and specific marker of adenocarcinomas of intestinal origin: an immunohistochemical survey of 476 primary and metastatic carcinomas. *Am.J.Surg.Pathol.* 27: 303-310, 2003.
63. Witek ME, Nielsen K, Walters R, Hyslop T, Palazzo J, Schulz S, Waldman SA. The putative tumor suppressor Cdx2 is overexpressed by human colorectal adenocarcinomas. *Clin.Cancer Res.* 11: 8549-8556, 2005.
64. Wong SC, Ng SS, Cheung MT, Luk LY, Chan CM, Cheung AH, Lee VH, Lai PB, Ma BB, Hui EP, Lam MY, Au TC, Chan AT. Clinical significance of CDX2-positive circulating tumour cells in colorectal cancer patients. *Br.J.Cancer* 104: 1000-1006, 2011.

Manuscrit 2. Constitutively active MEK1 is sufficient to induce epithelial-to-mesenchymal transition in intestinal epithelial cells and to promote tumor invasion and metastasis.

Étienne Lemieux¹, Sébastien Bergeron¹, Véronique Durand¹, Claude Asselin¹, Caroline Saucier¹ and Nathalie Rivard¹.

¹ Department of Anatomy and Cellular Biology, CIHR Team on Digestive Epithelium, Faculty of Medicine and Health Sciences, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada

Statut de l'article : Publié - Int J Cancer. 2009 Oct 1;125(7):1575-86

Avant-propos

Une étude effectuée dans notre laboratoire a démontré que l'activation constitutive du sentier MEK/ERK est suffisante pour induire la transformation oncogénique des cellules épithéliales intestinales normales IEC-6 (Boucher et al., 2004; Komatsu et al., 2005; Voisin et al., 2008)). Il a été démontré que cette transformation était attribuable à l'acquisition de propriétés associées aux cellules cancéreuses, notamment un besoin réduit en facteurs de croissance pour leur prolifération, une capacité à croître à post-confluence et en indépendance d'ancrage (résistance à l'anoikose). Dans l'ensemble, ces observations supportent fortement la notion que la signalisation dépendante de MEK peut jouer un rôle crucial dans l'induction et le maintien de la transformation tumorale des CEIs. La perte des interactions cellule-cellule causée par une dissociation des structures de jonctions épithéliales préexistantes augmente la motilité cellulaire et les capacités d'invasion associées à la transformation. Ce changement phénotypique d'une morphologie épithéliale vers un devenir fibroblastique est appelé EMT pour *Epithelial to Mesenchymal Transition*. C'est un processus important impliqué dans la dissémination des cellules tumorales et la formation de métastases. Par contre, le rôle exact de l'activité de MEK1 dans l'induction de l'EMT, l'invasion tumorale et la formation de métastases restait à évaluer.

Contribution

J'ai effectué la totalité des expériences sur les modèles cellulaires, incluant les immunobuvardages, les immunofluorescences, les ChIP, les RT et qPCR. J'ai généré les shRNA dirigés contre Fra-1 et EGR-1 et effectué la totalité des expériences sur ces modèles cellulaires. Véronique Durant a effectué les essais de zymographie sur les cellules IEC-6 caMEK1 (Fig. 4B) ainsi que les premiers essais d'invasion en présence des inhibiteurs de MMP2/9 (Fig. 4C). Sébastien Bergeron a effectué les essais de métastases chez les souris immunodéficientes (tail vein; Fig. 5B). Claude Asselin et Caroline Saucier ont révisé le manuscrit avant soumission et ont apporté leur expertise à l'amélioration des conclusions de l'étude et du manuscrit. J'ai dirigé le projet de recherche, rédigé la première version du document, préparé les figures et effectué les expériences pour satisfaire les évaluateurs. Nathalie Rivard a participé et coordonné la conception de l'étude de même qu'à la rédaction du manuscrit.

Résumé

Dans le but de déterminer le rôle de l'activité MEK/ERK dans la tumorigénèse intestinale, deux modèles cellulaires ont été générés soit les cellules épithéliales intestinales (IEC-6) exprimant de façon constitutive la forme sauvage de MEK1 (wtMEK1) ou la forme active de MEK1 (caMEK1). Nos résultats démontrent que l'expression du caMEK1 est suffisante pour induire l'EMT. Cette dernière est caractérisée par la réduction des marqueurs épithéliaux tels que la E-cadhérine, l'occludine, le Lgl, la ZO-1 ainsi que l'actine corticale et l'induction de marqueurs mésenchymateux tels que la N-cadhérine, la vimentine et les facteurs de transcription Snail1 et Snail2. L'analyse des promoteurs de Snail1 et de Snail2 démontre que les facteurs EGR-1 et Fra-1 sont respectivement responsables, en grande partie, de l'induction de Snail1 et Snail2. Des essais d'invasion sur Matrigel montrent que les cellules exprimant le caMEK1, en comparaison avec la forme sauvage, possèdent des capacités invasives. Ceci s'explique en partie par les niveaux élevés de MMP2 et MMP9 dans le milieu de culture qui ont été mis en évidence par des analyses de zymographie. De plus, ces cellules sont capables d'induire la formation de tumeurs et de métastases chez la souris immunodéficiente. L'analyse de tumeurs formées montre l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la formation de métastases colorectales tels que l'ostéopontine, la

COX2 et l'uPAR. En conclusion, nos résultats démontrent, pour la première fois, que l'activation constitutive de MEK1 dans les cellules épithéliales intestinales est suffisante pour induire une transition épithélio-mésenchymateuse associée à l'acquisition de capacités tumorales et invasives. Ainsi, en plus d'identifier le rôle de MEK1 dans la formation de métastases, cette étude a permis d'identifier certains des effecteurs de MEK1 qui sont impliqués dans ce processus.

Abstract

Constitutive activation of the MAP Kinase Kinase MEK1 induces oncogenic transformation in intestinal epithelial cells. Loss of cell-cell adhesion followed by the dissociation of epithelial structures is a prerequisite for increased cell motility and tumor invasion. This phenotypic switch is designated epithelial to mesenchymal transition (EMT). EMT also plays an important role in determining the dissemination of tumors. However, the role of MEK1 in intestinal EMT, tumor invasion and metastasis has not been elucidated. To determine the functions of activated MEK1 in intestinal tumorigenesis, we established intestinal epithelial cell lines that overexpress wild-type MEK1 (wtMEK) or activated MEK1 (caMEK). Our results indicate that expression of caMEK is sufficient to induce EMT as confirmed with the induction of N-cadherin, vimentin, Snail1 and Snail2 while a reduction in E-cadherin, occludin, ZO-1 and cortical F-actin was noted. The Snail1 and Snail2 promoter analyses revealed that Egr-1 and Fra-1, an AP-1 protein, are respectively responsible for MEK1-induced Snail1 and Snail2 expression. Cells expressing activated MEK1 clearly acquired an invasive capacity as compared to wtMEK-expressing cells. Zymography studies confirmed elevated levels of MMP2 and MMP9 activities in media of caMEK-expressing cells. Importantly, cells expressing activated MEK1 induced tumors with short latency in correlation with their ability to induce experimental metastasis *in vivo* and to express factors known to promote colorectal cancer cell metastasis. In conclusion, our results demonstrate, for the first time, that constitutive activation of MEK1 in intestinal epithelial cells is sufficient to induce an epithelium-mesenchymal transition associated with tumor invasion and metastasis.

Introduction

Ras proteins act as molecular switches that cycle between active GTP-bound and inactive GDP-bound forms and function as essential components of signal transduction pathways regulating cell growth. Activating mutations of the Ras family members are among the most common genetic events in human tumorigenesis¹. For example, *K-ras* is mutated in nearly 50% of colorectal tumors at a relatively early stage of the carcinogenic process² and despite extensive research, the primary reason for this high frequency remains unclear.

The most studied downstream effector pathway of K-ras is the mitogenic serine/threonine kinase cascade called Raf/MEK/ mitogen-activated protein kinase (MAPK). Indeed, upon activation by growth factor-stimulated receptors, activated Ras complexes with and promotes Raf kinases which in turn activate MAPK kinases (MEK1 and MEK2), resulting in activation of extracellular signal regulated kinases (ERK1 and ERK2)³. Activated ERKs then translocate into the nucleus where they phosphorylate and activate nuclear transcription factors such as Elk-1, ATF-2 and ETS1/2 resulting in immediate-early gene induction⁴. Studies on cultured intestinal epithelial cells and many other cell types have revealed a close correlation between ERK activation and DNA synthesis while pharmacological or molecular inhibition of cellular ERK activity has been shown to block cell cycle progression⁵⁻⁹. Notably, the phosphorylated and activated forms of ERK1/2 have mostly been detected in the nucleus of undifferentiated proliferative crypt cells in human fetal small intestine¹⁰, hence supporting the role of these kinases in the control of cell proliferation in intestinal crypts.

The critical involvement of these Ras downstream effectors in intestinal tumorigenesis is also supported by a number of experimental observations. Firstly, mutations of *BRAF*, a member of the Raf family, are associated with increased kinase activity and have been found in 9–11% of colorectal cancers; many of those with such mutations are at early Dukes' stage (A and B)¹¹⁻¹². Furthermore, *BRAF* mutations are frequently identified in sporadic colorectal cancer with microsatellite instability¹³. Secondly, it has been demonstrated that MEK is phosphorylated and activated in 30-40% of adenomas¹⁴⁻¹⁵ and in 76% of colorectal tumors. Thirdly, colorectal cancers exhibit particularly high frequencies

of ERK activation ¹⁶ and some studies have reported that ERK1/2 activities are elevated in intestinal tumors ¹⁷⁻¹⁸. Fourthly, blockade of the MEK/ERK cascade suppresses growth of colon tumors *in vivo*, suggesting that ERK activation is indeed involved in intestinal tumor proliferation ¹⁹. Fifthly, we ²⁰ and others ²¹ have recently shown that expression of constitutively active MEK1 in non transformed rat intestinal epithelial crypt cell lines is sufficient to induce growth factor relaxation for DNA synthesis and to promote morphological transformation and growth in soft agar.

The mechanisms by which constitutive activation of MEK1 induces epithelial transformation are however still under investigation. Loss of cell-cell adhesion followed by the dissociation of epithelial structures is a prerequisite for increased cell motility and tumor invasion ²²⁻²³. This phenotypic switch, designated epithelial to mesenchymal transition (EMT), also plays a fundamental role in morphogenetic tissue remodeling during embryogenesis ²⁴. However, inappropriate reactivation of the EMT program is commonly observed during transition of benign adenomas to metastatic carcinomas ²³. Elucidating the molecular mechanisms that govern EMT is therefore essential in understanding the process of tumor progression. A signaling pathway possibly involved in the control of EMT is the ERK MAPK cascade. Indeed, there is some evidence suggesting a link between ERK pathway signaling and cell adhesion, invasion and metastasis in colorectal cancer ²⁵. For example, interactions between the cell-surface urokinase-type plasminogen activator (uPA) receptor and integrins are crucial for tumor invasion and metastasis, and uPA increases basal ERK activation in colon cancer cells ²⁶. Furthermore, protein kinase C II can activate colorectal cancer cell invasion by signals transmitted through the Ras/MEK pathway ²⁷. However, despite accumulating evidences showing a positive link between high MEK/ERK MAPK activities and intestinal transformation and cancer, the specific involvement of MEK/ERK signaling in EMT and metastasis of intestinal epithelial cells remains elusive. Hence, the present study was aimed at characterizing whether constitutive activation of MEK1 is sufficient to induce EMT and *in vivo* tumor invasion as well as metastasis and to analyze the potential involvement of some of the downstream molecular mechanisms in these processes.

Results

Constitutive active MEK1 induces loss of epithelial morphology and inhibition of epithelial junctional proteins.

Cancer cells of epithelial origin undergo EMT as an early event that leads to local invasion and metastasis to distant sites²². In a previous report, we had shown that expression of a constitutive active mutant of MEK1 (caMEK) in the intestinal epithelial cell line IEC-6 induced morphological transformation and growth in soft agar²⁰. In marked contrast, wtMEK expression had no effect on IEC-6 phenotype when compared to EV expression²⁰. In addition, at higher cell densities, the caMEK-expressing cells formed foci in contrast to EV and wtMEK-expressing epithelioid cells²⁰. The multi-layered morphology in caMEK-expressing cells became apparent at cell densities in which EV-expressing cells and wtMEK-expressing cells were forming a monolayer of contact-inhibited cells²⁰. The essential features of EMT are the disruption of intercellular contacts and the enhancement of cell motility, thereby leading to the release of cells from the parent epithelial tissue²²⁻²⁴. Therefore, in order to determine whether expression of caMEK is sufficient to induce EMT, foci from post-confluent caMEK-expressing cells were picked by aspiration and pooled in one caMEK-expressing cell population. The kinase activity of exogenous MEK in this cell population in comparison to the kinase activity of exogenous MEK present in control cell populations (EV and wtMEK-expressing cells) were first analyzed. Exogenous MEK activities were measured following immunoprecipitation with antibodies against HA tag and using recombinant ERK2 protein as substrate. Fig. 1A (left panel) shows that caMEK-expressing IEC-6 cells exhibited strong HA-MEK activity when compared to wtMEK-expressing IEC-6 cells after normalization of expression levels. The molecular manifestation of wild-type and activated MEK expression on endogenous ERK expression and activity was also analyzed. As shown in Fig. 1A (right panel), caMEK-expressing IEC-6 cells consistently showed a very slight increase in ERK1/2 phosphorylation levels in comparison to EV and wtMEK-expressing cells. Expression of ERK proteins was similar in all cell populations. However, an additional species with low electrophoretic mobility was detected with the antibody recognizing the bi-phosphorylated and activated forms of ERK1/2 in caMEK-expressing cell population (Fig. 1A, right panel, see arrowhead). Interestingly, treatment with the MEK inhibitor, U0126, completely abrogated MEK

activity as well as ERK phosphorylation.

We next verified whether activation of MEK1 was sufficient to induce EMT phenotype. As visualized in Fig. 1B, phase-contrast microscopy revealed that caMEK-expressing cells underwent a morphological change from an epithelial morphology to an elongated morphology. Indeed, cells clearly exhibited loose cell-to-cell contacts and a fibroblast-like appearance when compared to wtMEK-expressing control cells (Fig. 1B). After caMEK expression, the epithelial markers E-cadherin and ZO-1 disappeared from cell-cell junctions (Fig. 1C, panels 3 and 6). F-actin pattern was rearranged from the typical epithelial circumferential pattern to a pattern typical of fibroblastic/mesenchymal cells (Fig. 1C, panel 9). E-cadherin, ZO-1, occludin and Vimentin expression in these cells was also examined by Western blotting, and in agreement with their phenotypic change, E-cadherin, ZO-1 and occludin expression was clearly decreased (Fig. 1D, left panel). Interestingly, expression of Vimentin, a mesenchymal marker, was markedly upregulated in caMEK-expressing cells compared to wtMEK-expressing cells (Fig. 1D, right panel). In addition, caMEK-expressing cells exhibited N-cadherin expression while the wtMEK-expressing cells clearly did not express this molecule (Fig. 1D, right panel). Up-regulation of Vimentin and N-cadherin is a characteristic phenomenon during EMT²². Finally, treatment with U0126 during 72 h efficiently rescued the epithelial phenotype of caMEK-expressing IEC-6 cells (Fig. 1B, panel 4), markedly attenuated Vimentin and N-cadherin expression (Fig. 1D, right panel) and partially restored E-cadherin and ZO-1 expression while occludin protein levels were returned to control levels (Fig. 1D, left panel). Treatment of our cell populations with U0126 had no effect on cell survival as verified by Trypan blue exclusion assay (data not shown). Indeed, as shown in Fig. 1B (panel 4), cells appear healthy and neither nuclei fragmentation nor detached cells were observed following the use of U0126. These data indicate that induction of EMT by caMEK was a direct consequence of enhanced MEK activity in IEC-6 cells.

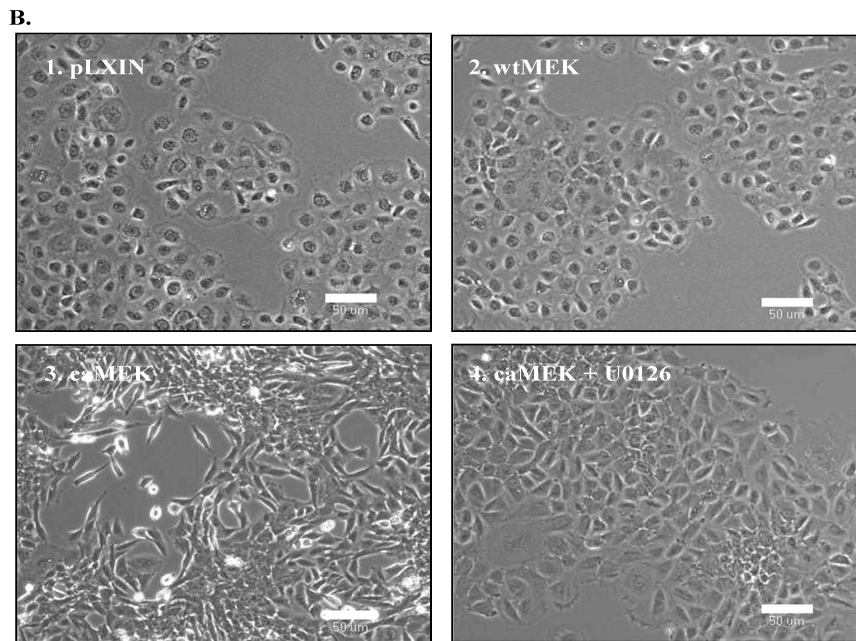
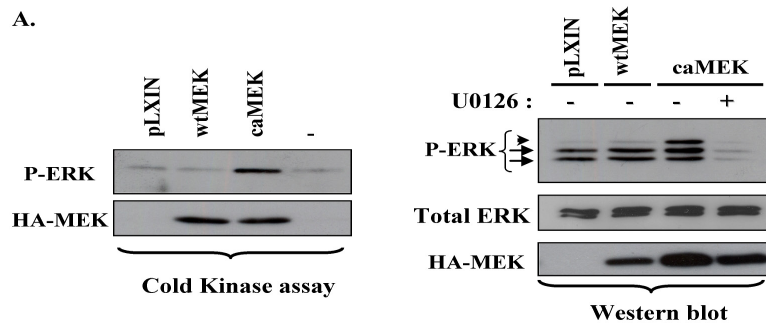


Figure 1 A, B- Constitutive active MEK1 induces a loss of epithelial morphology and inhibition of epithelial junctional proteins. **A- Left panel.** Cell extracts (200 μ g) were immunoprecipitated with a specific antibody to HA. Levels of immunoprecipitated HA-wtMEK or HA-caMEK were analyzed by Western blotting. Kinase activity of HA-wtMEK and HA-caMEK is demonstrated by the phosphorylation of recombinant ERK2 revealed by Western blot with the antibody recognizing phosphorylated forms of ERK1/2. - : no cell lysate was added in the assay. **Right panel.** Cell lysates were prepared from asynchronously growing cells stably expressing pLXIN, wtMEK and caMEK. caMEK-expressing cells were incubated for 2 h with DMSO or 20 μ M U0126. Equal amounts of proteins were separated by SDS-PAGE for Western blot analysis of HA tag, phosphorylated and total ERK proteins; arrowhead indicates an additional species with low electrophoretic mobility that could correspond to ERK1b. **B-** Representative phase/contrast pictures of subconfluent pLXIN-, wtMEK- and caMEK-expressing cells (panels 1-3). In panel 4, caMEK-expressing cells were treated with 20 μ M U0126 during 72 h. Bars: 50 μ M.

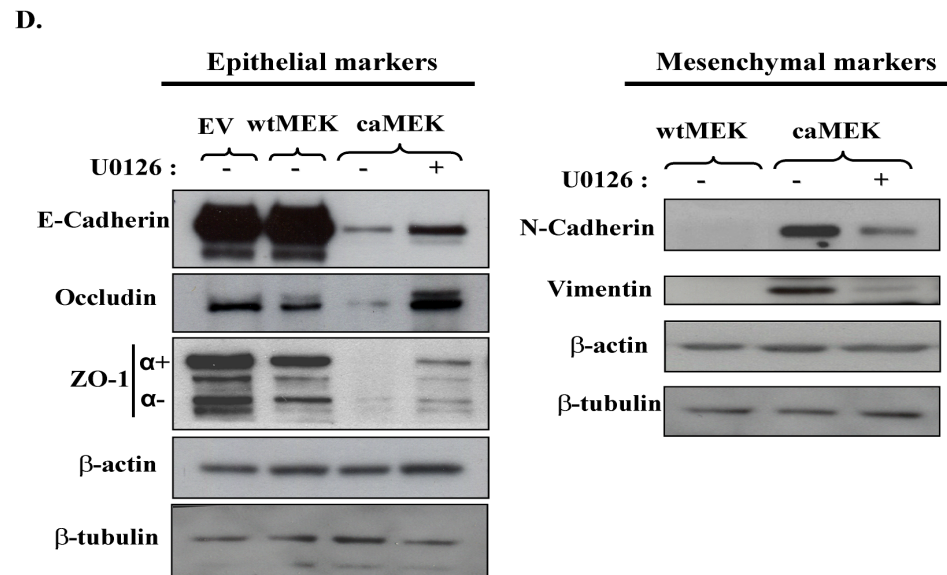
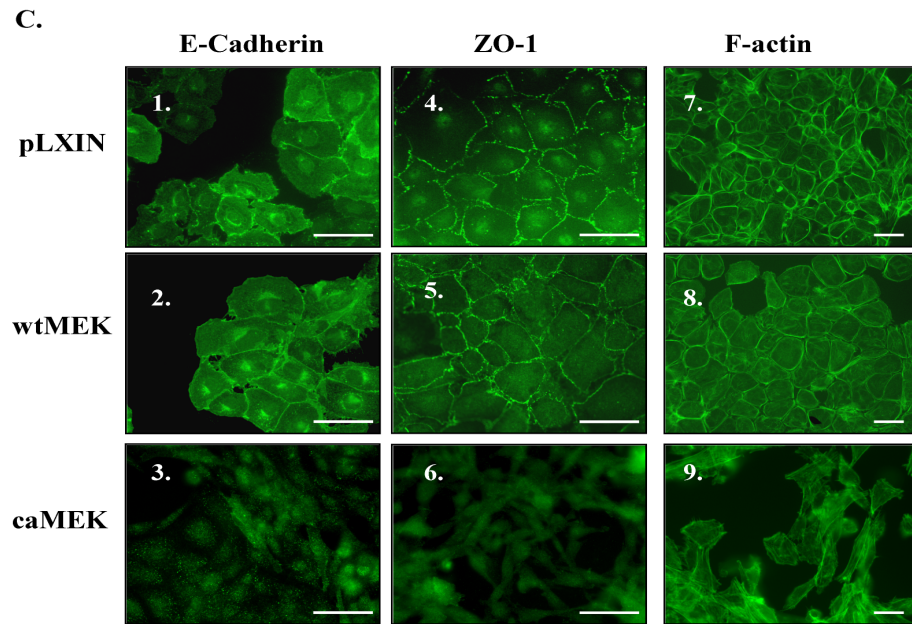


Figure 1 C, D- Constitutive active MEK1 induces a loss of epithelial morphology and inhibition of epithelial junctional proteins. pLXIN-, wtMEK- and caMEK-expressing cells were fixed for immunofluorescence and stained for E-cadherin (panels 1-3), ZO-1 (panels 4-6) or F-actin (panels 7-9) with FITC-phalloidin. Scale bars 50 μ m. **D-** Equal amounts of whole cell lysates from wtMEK- and caMEK-expressing cells (treated or untreated with 20 μ M U0126 during 72 h) were separated by 7.5% or 10% SDS-PAGE, and proteins analyzed by Western blotting with specific antibodies against E-cadherin, occludin-1, ZO-1, N-cadherin, Vimentin, α -actin and β -tubulin.

Constitutive active MEK1 downregulates E-cadherin expression and enhances Snail1 and Snail2 expression through Egr-1 and Fra-1.

In recent years, several direct transcriptional repressors of E-cadherin (Snail1, Snail2, deltaEF1, SIP1, and E47) have been identified³⁴⁻³⁹. These proteins act downstream in EMT-inducing signal transduction pathways activated by transforming growth factor- β , fibroblast growth factor (FGF), epidermal growth factor (EGF), integrin engagement and hypoxia⁴⁰⁻⁴⁴. Snail family members directly interact with the E-box response elements in the proximal *E-cadherin* gene promoter and could actively repress transcription by recruiting transcriptional corepressors such as mSin3A⁴³. In addition, Snail1/Snail2 and deltaEF1/SIP1 proteins mediate up-regulation of genes implicated in cell invasion and motility (e.g., Vimentin, members of the MMP family of proteases, fibronectin). Herein, RT-PCR analysis confirmed that E-cadherin gene expression was clearly down-regulated in caMEK-expressing cells in comparison to wtMEK expressing cells (Fig. 2A). Therefore, we next determined whether caMEK directly affected expression of Snail1, Snail2, SIP1, E47 and Twist by quantitative RT-PCR (Q-PCR) analysis. As shown in Fig. 2B, Snail1 and Snail2 mRNA levels were respectively and significantly up-regulated by 4.4-fold and 5-fold ($p < 0.001$) in caMEK-expressing cells when compared to cells expressing wtMEK. However, Twist, SIP1 and E47 expressions were not significantly altered in caMEK-expressing cells in comparison to wtMEK-expressing cells (data not shown), indicating that Snail1 and Snail2 are the most prominent E-cadherin transcriptional repressors induced by caMEK in intestinal epithelial cells.

We further analyzed the molecular mechanisms by which caMEK signaling induced Snail1 and Snail2 expression and investigated the potential involvement of candidate transcription factors. Recently, hepatocyte growth factor (HGF) has been shown to induce scattering of lens epithelial cells through ERK/Egr-1-mediated upregulation of Snail1⁴⁵. Egr-1 is a zinc-finger transcription factor that binds DNA sequences containing the consensus binding site GCG(G/T)GGGCG⁴⁶. Herein, a survey of the Snail1 rat promoter sequence using Transcription Element Search System (TESS) software identified 1 strong putative Egr-1 binding site between nucleotides -1349 and -1341 upstream of the Snail1 gene transcriptional start site. We thus verified whether Egr-1 was induced by caMEK in

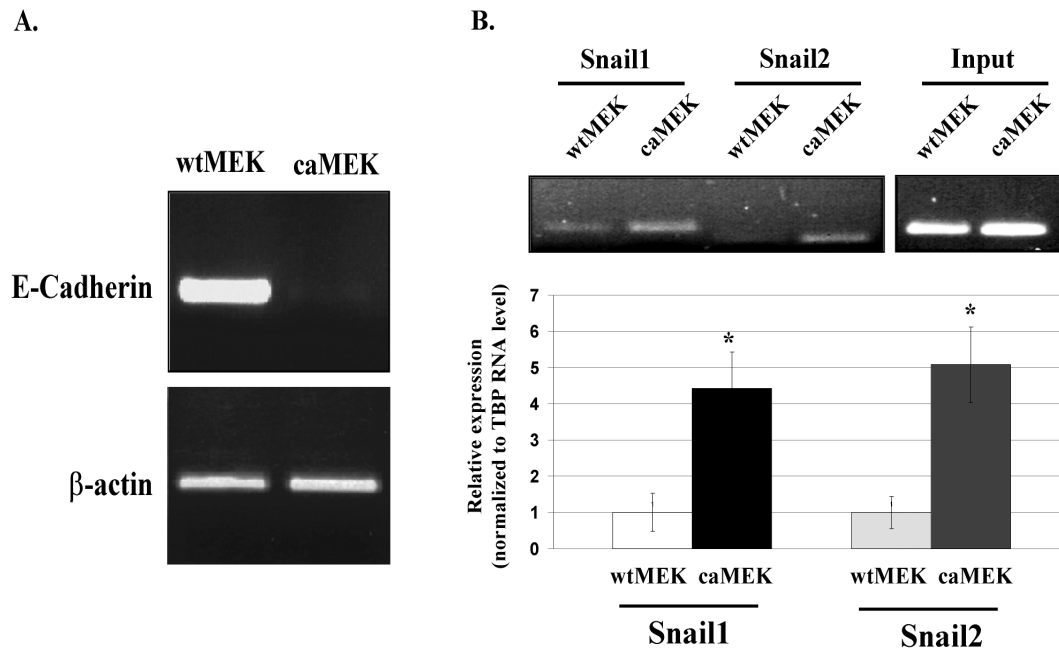


Figure 2- Constitutive active MEK1 downregulates E-cadherin and enhances Snail1 and Snail2 expression. **A-** wtMEK- and caMEK-expressing cells were lysed and RNA isolated for E-cadherin gene expression by RT-PCR. **B-** wtMEK- and caMEK-expressing cells were lysed and total RNA isolated for Snail1 and Snail2 gene expression. Q- PCR was performed as described in Material and Methods. Representative RT-PCR data are presented. The relative level of each RNA was calculated using the standard curve method and normalized to the corresponding TBP RNA level. *, significantly different from control (wtMEK) at $p < 0.001$ (Student's *t* test).

intestinal epithelial cells. Western blot analysis shown in Fig. 3A demonstrates that Egr-1 protein was markedly induced by 3-fold in caMEK-expressing cells as compared to control cells. Of note, treatment of cells with the MEK inhibitor, U0126, completely abolished Egr-1 expression. To determine whether Egr-1 physically associates with the endogenous promoter of Snail1, ChIP assays were performed with anti-Egr-1 antibodies in wtMEK- and caMEK-expressing cells. As shown in Fig. 3B, increased *in vivo* binding of Egr-1 to Snail1 promoter was found in caMEK-expressing cells compared to wtMEK-expressing cells. The survey of the Snail1 promoter sequence also identified 4 putative AP-1 binding sites upstream of the transcriptional start site. Since AP-1 transcription factor complexes are downstream effectors of ERK MAPKs⁴, expression of the main proteins forming AP-1 complexes in colon cancer cells⁴⁷, namely c-jun, c-fos and Fra-1, were analyzed. Western blot analysis shown in Fig. 3A illustrates that Fra-1 protein was strongly induced by 15-fold

in caMEK-expressing cells comparatively to control cells, whereas no detectable change was observed in c-fos and c-jun expression. It is noteworthy that treatment of cells with the MEK inhibitor, U0126, completely abolished Fra-1 expression. However, ChIP assays did not reveal any difference in the binding of Fra-1 to the Snail1 promoter in cells expressing the activated MEK1 mutant (data not shown). The analysis of the Snail2 promoter sequence identified 2 strong putative AP-1 binding sites between nucleotides -334 and -327 and -264 and -257 upstream of the Snail2 gene transcriptional start site. ChIP assays revealed increased *in vivo* binding of Fra-1 to Snail2 promoter in caMEK-expressing cells compared to wtMEK-expressing cells (Fig. 3C). Hence, our findings suggest that activated MEK1 induces the expression of Snail1 and Snail2 through Egr-1 and AP-1 binding sites, respectively.

To further investigate the importance of Egr-1 and Fra-1 in caMEK-induced Snail1 and Snail2, recombinant lentiviruses encoding anti-Egr-1 and anti-Fra-1 short hairpin RNAs (shRNAs) were developed to stably suppress Egr-1 and Fra-1 mRNA levels. Several lentiviral constructs were generated and tested for their ability to knock down these transcription factors. Two of these viral shRNAs were selected and designated as shEgr-1 and shFra-1. caMEK-expressing cells were henceforth infected with shEgr-1 or shFra-1 lentiviruses. The pLentiV5-U6 lentiviral vector, which co-expresses a blasticidin S resistance gene, allowed the selection of pure populations of transduced cells within 6 days. In addition, a shRNA against GFP RNA sequence was also generated leading to the production of a caMEK cell population stably expressing this shRNA as a control. Cells infected with shEgr-1 exhibited strongly reduced Egr-1 protein synthesis, in contrast to non infected cells (NI) and to cells infected with shRNA targeting the GFP sequence (Fig. 3D). Q-PCR analysis shown in Fig. 3E demonstrates that the down-regulation of Egr-1 expression in caMEK-expressing cells significantly decreased Snail1 expression, hence confirming the contribution Egr-1 in MEK1-induced Snail1. Cells infected with shFra-1 exhibited strongly reduced Fra-1 protein synthesis, in contrast to non infected cells (NI) and to cells infected with shRNA targeting the GFP sequence (Fig. 3D). Interestingly, down-regulation of Fra-1 expression in caMEK-expressing cells significantly decreased Snail2 expression (Fig. 3F), hence confirming the contribution Fra-1 in MEK1-induced Snail2.

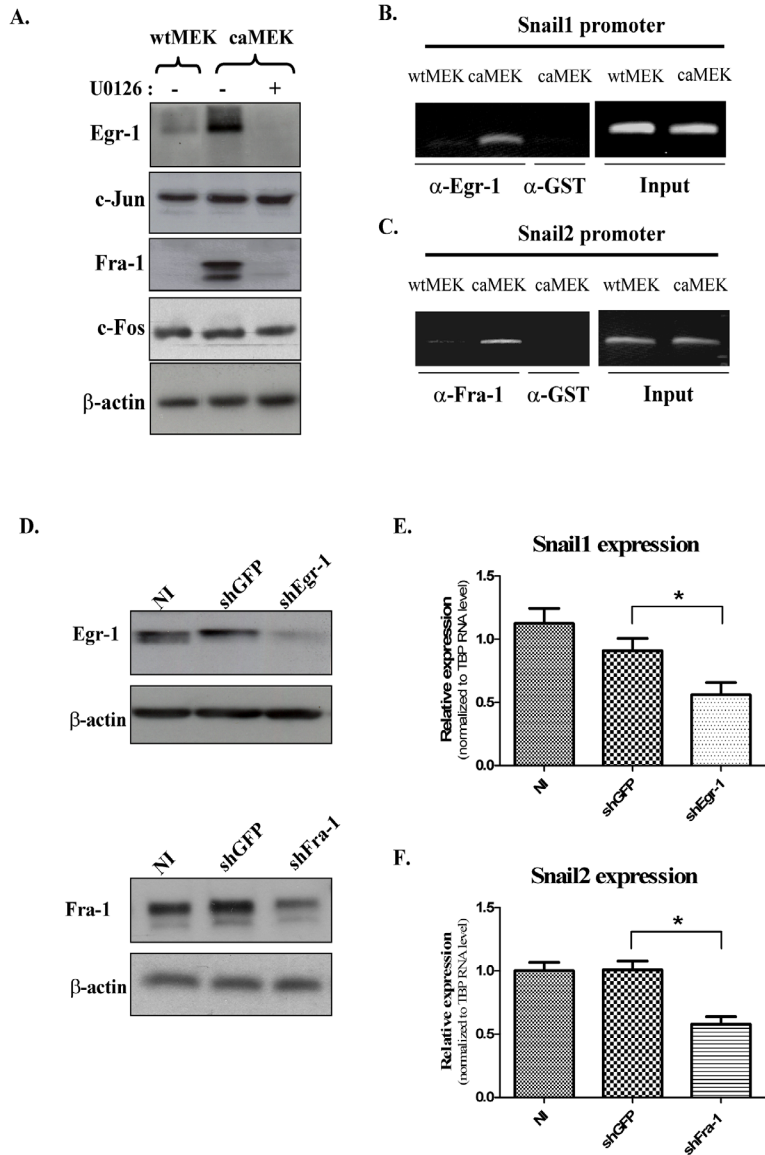


Figure 3. Constitutive active MEK1 enhances Snail1 and Snail2 expression through Egr-1 and Fra-1. **A-** Equal amounts of whole cell lysates from wtMEK- and caMEK-expressing cells were separated by 10% SDS-PAGE, and proteins analyzed by Western blotting with specific antibodies against Egr-1, Fra-1, c-jun, c-fos and β -actin. In some experiments, caMEK-expressing cells were incubated with DMSO or 20 μ M U0126 during 48 h. **B-** ChIP assays were performed with wtMEK- and caMEK-expressing cell extracts. Chromatin was immunoprecipitated with an irrelevant antibody (α -GST) or with an antibody against Egr-1 or Fra-1 (not shown). Region of the Snail1 rat promoter including the Egr-1 binding element, was amplified by PCR. DNA levels were assessed by PCR on 10% of input DNA prior to immunoprecipitation. Amplified products were separated on 2% agarose gels. **C-** ChIP assays were performed with wtMEK- and caMEK-expressing cell extracts. Chromatin was immunoprecipitated with an irrelevant antibody (α -GST) or with an antibody against Fra-1. Regions of the Snail2 rat promoter including the AP-1 binding sites were amplified by PCR. DNA levels were assessed by PCR on 10% of input DNA prior to immunoprecipitation. Amplified products were separated on 2% agarose gels. **D-** caMEK cells were stably infected with lentiviruses encoding for a control shRNA (against GFP sequence) or encoding a Egr-1-specific shRNA or encoding a Fra-1-specific shRNA. These stable cell populations were thereafter lysed and proteins were analyzed by Western blotting for expression of Egr-1, Fra-1 and β -actin with specific antibodies. NI: non infected cells. **E and F-** caMEK cells stably expressing shGFP, shEgr-1 or shFra-1 were lysed and total RNA isolated for Snail1 and Snail2 gene expression. Q-PCR was performed as described in Material and Methods. The relative level of each RNA was calculated using the standard curve method and normalized to the corresponding TBP RNA level. *, significantly different from control (caMEK/shGFP) at $p < 0.001$ (Student's *t* test).

to immunoprecipitation. Amplified products were separated on 2% agarose gels. **C-** ChIP assays were performed with wtMEK- and caMEK-expressing cell extracts. Chromatin was immunoprecipitated with an irrelevant antibody (α -GST) or with an antibody against Egr-1 or Fra-1. Regions of the Snail1 rat promoter including the Egr-1 binding element, was amplified by PCR. DNA levels were assessed by PCR on 10% of input DNA prior to immunoprecipitation. Amplified products were separated on 2% agarose gels. **D-** caMEK cells were stably infected with lentiviruses encoding for a control shRNA (against GFP sequence) or encoding a Egr-1-specific shRNA or encoding a Fra-1-specific shRNA. These stable cell populations were thereafter lysed and proteins were analyzed by Western blotting for expression of Egr-1, Fra-1 and β -actin with specific antibodies. NI: non infected cells. **E and F-** caMEK cells stably expressing shGFP, shEgr-1 or shFra-1 were lysed and total RNA isolated for Snail1 and Snail2 gene expression. Q-PCR was performed as described in Material and Methods. The relative level of each RNA was calculated using the standard curve method and normalized to the corresponding TBP RNA level. *, significantly different from control (caMEK/shGFP) at $p < 0.001$ (Student's *t* test).

Constitutive active MEK1 induces invasion capacity through MMP2 and MMP9 protease expression and activities.

Since the suppression of E-cadherin is related to cancer cell migration during EMT²², the net effect of caMEK expression was determined on invasion by using BD Biocoat Matrigel invasion chambers, in presence of 20 mM hydroxyurea, a pharmacological inhibitor of the cellular ribonucleoside reductase, in order to arrest cell cycle in G1/S phase³⁰, as we previously done³¹. As shown in Fig. 4A, caMEK-expressing cells clearly acquired an invasive capacity as compared to wtMEK-expressing cells which never invaded Matrigel; this effect was completely abolished by treatment of caMEK-expressing cells with U0126. Since the migration of cells through extracellular matrices requires the activity of MMPs²³, β -casein and gelatin zymographies were therefore used to determine whether caMEK-expressing cells secrete β -casein- and gelatin-degrading MMPs. Gelatin works well for MMP-2 and MMP-9, whereas MMP-1, MMP-3, MMP-7, MMP-8 and MMP-10 are better identified in casein-containing gels⁴⁸. Using casein zymography, no significant difference was detected between conditioned media of caMEK-expressing cells compared to conditioned media of wtMEK-expressing cells (data not shown). By contrast, in gelatin zymography, the M_r 72,000 MMP-2 proenzyme (progelatinase A) was revealed in conditioned media of caMEK-expressing cells, in addition to the M_r 64,000 and M_r 62,000 activated MMP-2 species (Fig. 4B). MMP-9 (gelatinase B) activity was also detected in conditioned media of caMEK-expressing cells (Fig. 4B). Addition of the specific inhibitor of MMP-2/9 to the medium of caMEK-expressing cells resulted in the complete disappearance of the molecular species revealed in gelatin zymography (data not shown) and significantly reduced invasion capacity of caMEK-expressing cells (Fig. 4C). To exert its enzymatic activity, MMP-2 requires cleavage and activation by MT1-MMP or MMP14. As shown in Fig. 4D, MT1-MMP as well as MMP-2 and MMP-9 expressions were barely detectable in wtMEK-expressing cells whereas high levels of expression of each MMP were observed in caMEK-expressing cells. Conversely, their expressions by caMEK-expressing cells were significantly down-regulated after a 24-h incubation with the MEK inhibitor U0126. Taken together, these results indicate that MMP-2 and MMP-9 secreted by caMEK-expressing cells are the most important MMPs involved in invasion through Matrigel.

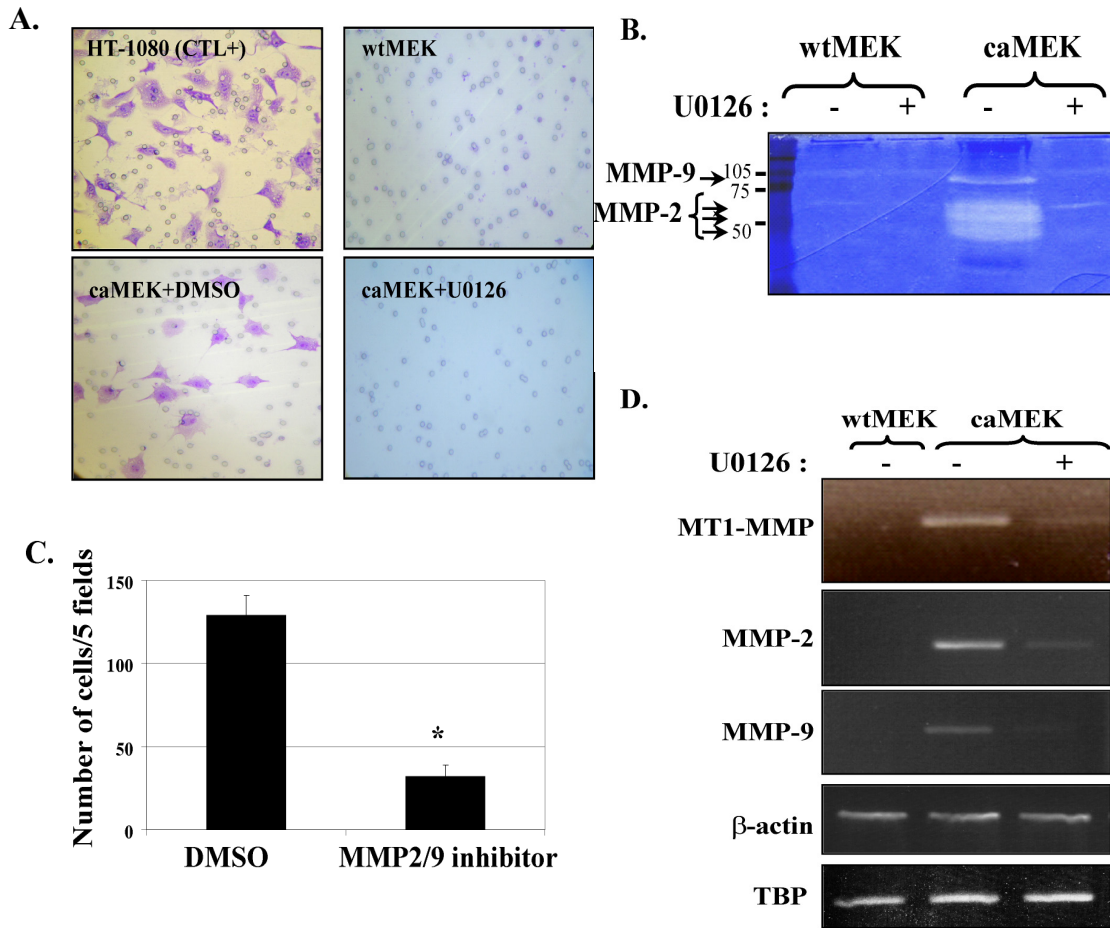


Figure 4. Constitutive active MEK1 induces invasion capacity through MMP2 and MMP9 protease expression and activity. **A-** Representative images from the invasion assay. Invasion of cells through Matrigel and the 8-mm pores was studied using Matrigel-coated Transwells. The cells were incubated for 48 h in presence of DMSO or 10 μ M U0126. Thereafter, cells were fixed and stained with 0.5% crystal violet solution. **B-** Gel zymography analysis was performed on cell media of confluent IEC-6 cells expressing wtMEK and caMEK, either treated or untreated with U0126 (10 μ M) during 24 hours. **C-** Invasion of cells through Matrigel and the 8-mm pores was studied using Matrigel-coated Transwells in absence (DMSO) or presence of MMP2/MMP9 inhibitor (10 μ M) during 48 h. Thereafter, cells were fixed and stained with 0.5% crystal violet solution. The number of cells was counted in five fields. **D-** wtMEK- and caMEK-expressing cells were lysed and RNA isolated for MT1-MMP, MMP2, MMP-9, TBP and β -actin gene expression by RT-PCR.

Intestinal cells expressing activated MEK1 induce tumor formation and metastasis in nude mice.

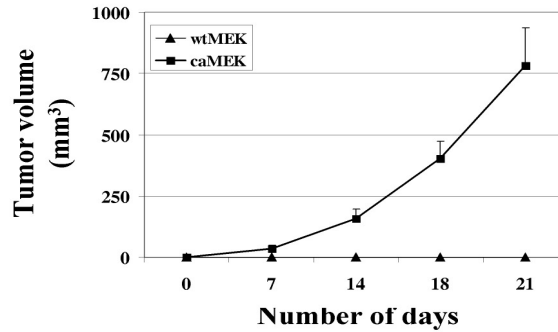
The tumorigenicity of IEC-6 cell lines was next assessed after their s.c. injection into the flank of nude mice. Cells expressing wtMEK failed to develop tumors 90 days after

inoculation. In contrast, IEC-6 transformed with caMEK induced palpable tumors with a short latency of 7 days after their injection (Fig. 5A). We next investigated whether caMEK could induce tumor metastasis *in vivo* in an experimental metastasis assay. Nude mice injected into the tail vein with cells expressing the caMEK showed extensive lung metastasis within 21 days, whereas cells expressing wtMEK failed to show any significant lung colonization (Fig. 5B). To further address this question, caMEK/IEC-6 cells expressing GFP protein were used⁴⁹. Cells were injected s.c. into nude mice and segments of lungs were excised and processed for fluorescence analysis 29 days after implantation of the tumor cells. As shown in Fig. 5C, lungs from mice bearing caMEK tumors exhibited GFP fluorescence. Accordingly, RT-PCR analysis revealed the presence of HA-tagged MEK1 in lungs (Fig. 5D). Finally, the expression of factors reported to be involved in colon cancer metastasis⁵⁰⁻⁵⁴ were also analyzed in cultured cells and in tumors resulting from the subcutaneous injection of caMEK-expressing cells. As shown in Fig. 5E and F, expression of cyclooxygenase-2 (COX-2), osteopontin (OPN) and $\alpha 6$ integrin subunit was up-regulated in caMEK-expressing cells in culture and in tumors while uPA expression was well detected in tumors. Taken together, these data show that activated MEK1 is sufficient to induce metastatic spread of intestinal epithelial cells probably through the increased expression of factors known to promote invasion and metastasis.

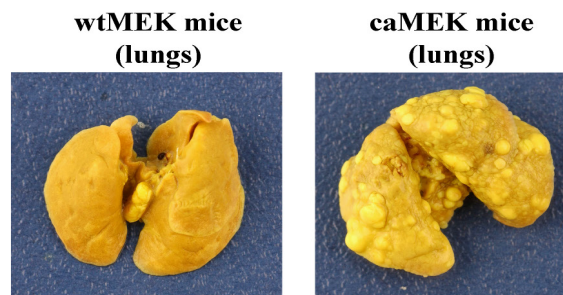
MEK/ERK signaling pathway controls Snail1 and Snail2 gene expression in human colorectal cancer cells.

To evaluate the contribution of endogenous MEK/ERK activities in EMT in human cell models, we analyzed the impact of U0126 treatment on Snail1 and Snail2 expression levels. As shown in Fig. 6A, a 48h-treatment of four colorectal cancer cell lines with U0126 efficiently blocked endogenous MEK activity as visualized by the marked inhibition of ERK1/2 phosphorylation. Interestingly, treatment of these cell lines with U0126 also resulted in the strong down-regulation of Egr-1 and Fra-1 protein levels. We have also analyzed expression levels of Snail1 and Snail2 in these cell lines by Q-PCR and found that inhibition of MEK/ERK activity significantly decreased Snail1 and Snail2 expression (Fig. 6B), indicating that expression of these transcription factors is likely dependent of ERK activity in these cell lines.

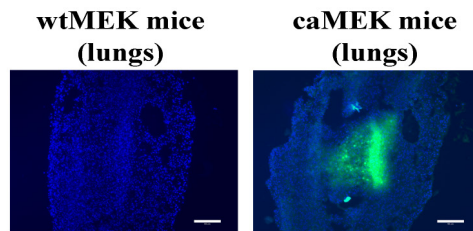
A.



B.



C.



GFP-associated fluorescence

D.

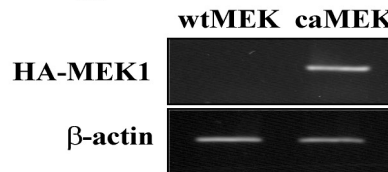


Figure 5. A-D Intestinal cells expressing activated MEK1 induce tumor formation and metastasis in nude mice. **A-** The growth of tumors (mm³) over time was measured after s.c. injection of 2×10^6 cells. The results represent the mean tumor volume obtained from two independent experiments in which at least six mice were injected for each cell line. **B-** Cells transformed by the caMEK are metastatic *in vivo*. Representative digital images of mice lungs 21 days after tail vein injection of 10^6 intestinal cells expressing wtMEK or caMEK. **C- and D-** Lentiviruses expressing GFP were used to infect wtMEK- and caMEK-expressing cells. Seven days following infection, cells were injected subcutaneously in nude mice and after 29 days, the presence of GFP fluorescence in lung tissue sections was analyzed by epifluorescence microscopy. Scale bars: 50 μ m. Total RNA was also extracted from lungs for RT-PCR analysis of HA-MEK1 expression; β -actin was used as gene of reference.

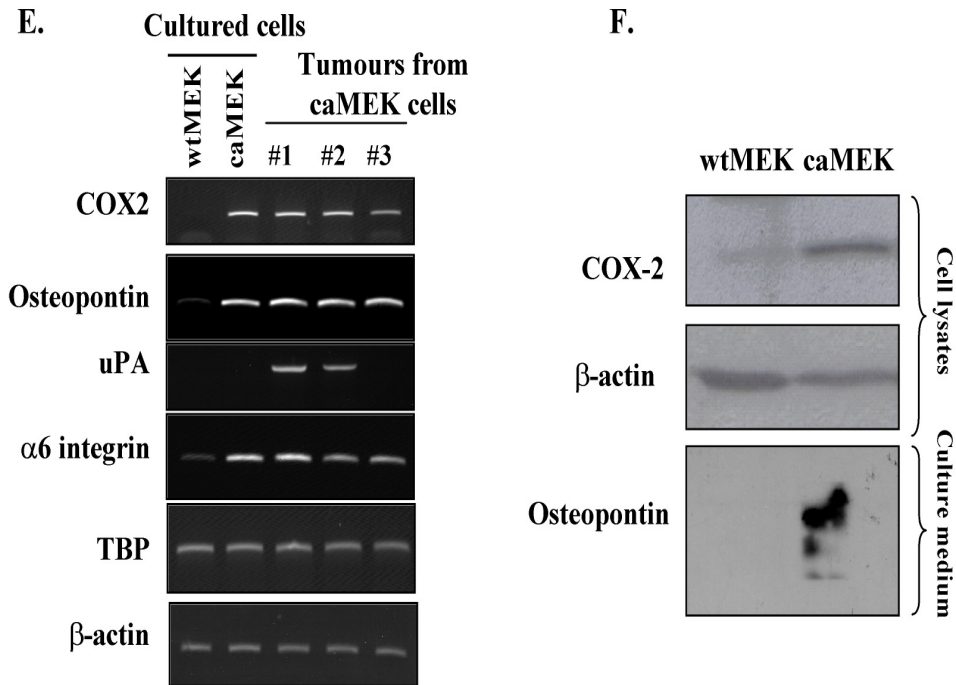
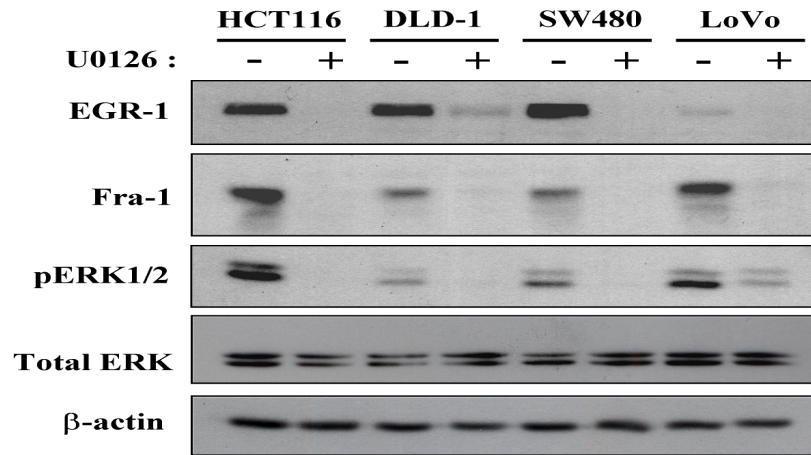


Figure 5.E-F Intestinal cells expressing activated MEK1 induce tumor formation and metastasis in nude mice. E- RNA isolated from wtMEK- and caMEK-expressing cells and from caMEK-expressing subcutaneous tumors was analyzed for COX-2, uPA, OPN, $\alpha 6$ integrin subunit and TBP gene expression by RT-PCR. **F-** Equal amounts of whole cell lysates from wtMEK- and caMEK-expressing cells were analyzed by Western blotting with specific antibodies against COX-2 (upper panel) and β -actin; equal amounts of culture medium from wtMEK- and caMEK-expressing cells were analyzed by Western blotting with specific antibodies against OPN (lower panel).

A.



B.

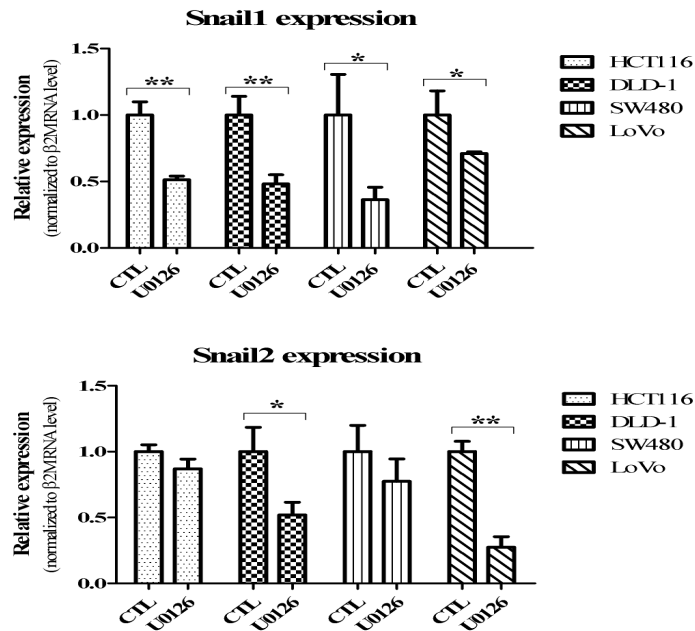


Figure 6. MEK activity controls expression of Snail1 and Snail2 in human colorectal cancer cells. Subconfluent growing HCT116, DLD-1, SW480 and LoVo cells were treated each day with 40 μ M U0126. After two days, cells were lysed. **A.** Proteins were analyzed by Western blotting for expression of β -actin, Egr-1, Fra-1, total and phosphorylated ERK with specific antibodies. **B.** Total RNA was isolated for Q-PCR performed to analyze Snail1 and Snail2 gene expression as described in Material and Methods. The relative level of each RNA was calculated using the standard curve method and normalized to the corresponding β 2MIC RNA level. *, significantly different from control (DMSO) at $p < 0.05$ (Student's t test). **: significantly different from control (DMSO) at $p < 0.005$ (Student's t test).

Discussion

Epithelial-mesenchymal transition (EMT) is a type of cell plasticity during which epithelial cells lose many of their epithelial characteristics and acquire properties that are typical of mesenchymal cells. EMT promotes tumor invasion and metastasis, and compelling evidence shows that it plays an important role in determining the dissemination of tumors⁵⁵. Our findings demonstrate that expression of activated MEK1 (not wtMEK1) is sufficient for EMT of intestinal epithelial crypt cells. The expression of caMEK resulted in reproducible loss of epithelial characteristics and a gain in mesenchymal characteristics associated with the ability to invade Matrigel (Fig.1, 2 and 4). More importantly, cells expressing activated MEK1 gained the ability to grow as tumors and had metastatic properties when injected *in vivo* in nude mice (Fig. 5).

Various mechanisms leading to specific gene repression and activation, transduction signalling pathways and a multitude of mediator molecules seem to cooperate in controlling EMT⁵⁶. The key molecular change occurring in EMT is E-cadherin down-regulation that represents the determinant step in reducing cell-to-cell adhesion, thereby leading to destabilisation of the epithelial architecture⁵⁶⁻⁵⁷. A number of transcription factors negatively affecting E-cadherin expression are now known. The zinc finger factor Snail1 is a strong repressor of E-cadherin transcription and a well known inducer of EMT. Snail1 has been found over-expressed in the tumour cells located at the invasive front, where it is responsible for the disruption of E-cadherin mediated cell-cell contacts and invasion⁵⁷. Other E-cadherin repressors that have been implicated in EMT are Snail2, E47, Twist, and the two-handed zinc factors deltaEF1 and SIP1^{34-44, 57}. In our experimental approach, we first investigated the regulatory mechanisms by which activated MEK1 stimulates the induction of Snail1 and Snail2 expression, since no modulation of Twist, SIP1 and E47 expression was observed. In addition, the importance of Snail1 in HGF-mediated cell scattering through ERK activation was previously demonstrated⁴⁵. The survey of the Snail1 rat promoter sequence identified only 1 strong putative Egr-1 binding site and it is located between nucleotides -1349 and -1341 upstream of the ratSnail1 gene transcriptional start site. We demonstrated that this is the putative regulatory element for Egr-1 binding in the rat Snail1 promoter in caMEK-expressing cells. This binding site that we have

identified herein seems identical in sequence to the one previously identified by Grotegut et al. (2006) at position -417 in the Snail1 human promoter. Previous studies have shown that increased activation of the ERK pathway enhances expression of Egr-1 and the binding of Egr-1 to a target sequence⁵⁸. Our data demonstrate that activated MEK1 increased the expression and *in vivo* binding of Egr-1 with the endogenous Snail1 promoter. A similar correlation has also been recently reported in human hepatocellular carcinomas, where Egr-1 expression, Snail1 expression, E-cadherin downregulation and Erk activation are all associated with cell scattering⁴⁵. In human colonic epithelial cells, it was recently reported that neurotensin stimulates expression of Egr-1 and the EGF receptor through MAPK activation⁵⁹. In addition, curcumin, the active ingredient of the rhizome of the turmeric plant (*Curcuma longa*), inhibits human colon cancer cell growth by suppressing gene expression of the EGF receptor through reduction of Egr-1 activity⁶⁰. Thus, the MEK/ERK/Egr-1 axis may be a valuable target in colorectal tumors.

The AP-1 family of transcription factors is known to be secondary transcriptional targets of ERK signalling⁶¹. In fibroblasts, transformation by Ras induces constitutive expression of c-Jun and Fra-1, which by themselves can promote a transformed phenotype⁶². The signalling pathway from Ras to AP-1 appears to be through the ERK MAPK cascade, as signalling through MEK1 modifies AP-1 activity and composition⁶³. Significantly, Fra-1 rather than c-Fos is the predominant protein that contributes to AP-1 activity in Ras- and MEK1-transformed fibroblasts^{62,63} as well as in colon cancer cells⁴⁷. The strong expression of Fra-1 in intestinal cells expressing activated MEK1 suggests that it may also contribute to some other aspects of the phenotype induced by activated MEK1. Recently, it has been demonstrated that in colorectal carcinoma cells with high levels of ERK signalling, Fra-1 acts to provide survival signals⁶⁴. Moreover, K-ras uses a MEK-ERK-Fra-1 pathway to deregulate Rho signaling, thus maintaining a disrupted actin cytoskeleton in colon cancer cells⁶⁵. In addition, Fra-1 has also been shown to be very prominent in the induction of Vimentin expression during Ha-RAS-induced EMT, in association with colon cell migration⁴⁷. Vimentin is not just a simple EMT marker; there is also evidence that Vimentin is increased in tumors from patients with colorectal cancer^{66,67}. Herein, we showed that Fra-1 expression was also important in the induction of Snail2 by activated

MEK1. To our knowledge, this is the first report describing the binding of this AP-1 protein to the Snail2 promoter. We could not detect, however, any difference in the binding of Fra-1 to the corresponding rat proximal AP-1 binding site described previously in mouse Snail1 promoter⁶⁸. This does not mean that this site was not important, since other AP-1 proteins might be involved. Finally, we cannot totally exclude the potential implication of other transcription factors such as NF- κ B and Sp1 which have been previously reported to induce Snail1 human promoter in response to oncogenic stimulation⁶⁹.

Our results obtained in human colorectal cancer cell lines in which MEK activity was blocked by U0126 highlight the close correlation between ERK activation and expression of Egr-1, Fra-1, Snail1 and Snail2 (Fig. 6). Current experiments are in progress in the laboratory to determine whether the inhibition of MEK restores some aspects of the epithelial phenotype in colorectal cancer cell lines. A modest increase in E-cadherin mRNA expression was detected in some cell lines after 48 h of treatment with U0126 (preliminary data), suggesting that prolonged MEK inhibition might be necessary. Alternatively, other molecular signalling mechanisms, known to mediate EMT, could be also implicated. Such signalling mechanisms include PI3K/Akt^{70,71}, TGF β /JNK/Smad3⁷², Src⁷³ and NF κ B⁷⁴. In this respect, some of these signalling proteins are mutated and/or hyperactivated in colorectal cancer and therefore should contribute to the maintenance of EMT-like phenotype in cancer cells. Nevertheless, our data argue that a key role of sustained MEK activity resulting from the constitutive activation of KRAS or BRAF in colorectal carcinoma cells may be to provide signals inducing not only proliferation^{19, 21, 25, 26, 75}, but also EMT.

Other studies have also demonstrated that expression of activated MEK1 induces EMT in other cell systems, particularly in MDCK cells⁷⁶⁻⁷⁸. For example, expression of caMEK in MDCK results in the destabilization of the three-dimensional architecture and the conversion of polarized epithelial cells into migrating mesenchymal-like cells⁷⁷. Furthermore, expression of activated MEK1 has been previously shown to also induce such morphological changes associated with EMT in intestinal epithelial cells^{21,79}, although the authors have not provided any experimental evidences and/or mechanistic insights to prove

that this was the case. Our study provides experimental proof that constitutive activation of MEK1 in intestinal epithelial cells is sufficient to cause EMT very likely through the induction of Egr-1 and Fra-1 transcription factors which bind to Snail1 and Snail2 promoters, enhancing their expression. The central role of Snail1 and Snail2 in inducing EMT has been described extensively⁴⁰.

In addition to cellular transformation and anchorage-independent growth, metastatic tumor cells need to gain numerous biological properties including cell motility, cell survival and secretion of extracellular matrix degrading enzymes in order to escape the primary tumor mass, and subsequently invade and colonize distant organs⁸⁰. Previous studies have suggested a role of MAPKs in invasion and metastasis of tumor cells⁸¹⁻⁸². Indeed, ERK activity was shown to be higher in metastatic cells, when compared to non metastatic human breast cancer cells⁸³⁻⁸⁵. Herein, we demonstrate by several evidences (shown in Fig.4 and 5) that activated MEK1 plays a major role in intestinal tumor progression and metastasis. Firstly, constitutive activation of MEK1 in normal intestinal epithelial cells induced migration through Matrigel as well as induced MT1-MMP, MMP-2, MMP-9 and uPA that promote degradation of the basement membrane, which is a key histological marker of a tumor's transition to invasive carcinoma⁸⁰. Secondly, 29 days after subcutaneous injection, the presence of caMEK-expressing cells was detected in lungs of nude mice. Thirdly, expression of activated MEK1 was sufficient to induce metastatic spread of intestinal transformed cells in the lungs of nude mice. Fourthly, increased expression of factors known to promote colorectal cancer cell metastasis was found in caMEK-expressing tumors. Indeed, it has been reported that COX-2 and OPN overexpressions are associated with metastatic potential of colorectal cancer cells⁵⁰⁻⁵² and clinical studies have identified uPA as an indicator of poor overall survival in patients with colorectal cancer⁵³. Furthermore, Enns *et al.*^{54,86} showed that $\alpha 6\beta 1$ and $\alpha 6\beta 4$ integrins are crucial for cancer cell adhesion in liver sinusoids. Finally, in support of our findings, microarray analysis in intestinal epithelial cells aimed at identifying MEK1 regulated genes showed significant OPN, COX2 and uPAR upregulation⁸⁷. Hence, in addition to demonstrating a role for MEK1 in inducing metastasis, our study also provides new insights in the nature of the downstream effectors possibly involved in this process.

The most common sites of colorectal metastasis are regional lymph nodes, liver, lungs and peritoneum and the first site of dissemination is usually the liver as a result of portal drainage⁸⁸. With the experimental approaches chosen to analyze if our intestinal cells expressing activated MEK1 can metastasize, we did not detect macroscopically liver metastases, although our cells express several markers of colorectal cancer liver metastasis including integrin $\alpha 6$ ⁵⁴. We speculate that within the time-frame of the experimental metastasis assay (21 days because after this time, mice demonstrated signs of respiratory distress), liver metastases did not have enough time to significantly develop and that caMEK-expressing cells were rapidly trapped in the well-vascularized lungs after their injection into tail vein or subcutaneously.

Finally, as we previously reported²⁰, little increase in ERK1/2 phosphorylation was observed in cells expressing activated MEK1 (Fig. 1A). One plausible explanation is that cells permanently stimulated by autoactive MEK1 are desensitized *via* multiple mechanisms including the previously reported ERK-mediated feedback inhibition of MEK⁸⁹ and possible increased basal levels of MAPK phosphatases⁹⁰⁻⁹², two phenomenons previously observed in rodent fibroblasts. However, an additional species with low electrophoretic mobility was detected with the antibody recognizing the bi-phosphorylated and activated forms of ERK1/2 in all three IEC-6 cell populations (Fig. 1A). Of note, this higher molecular mass form was prominent in caMEK-expressing cells. We have previously demonstrated that this high molecular form (46 kDa) correlates nicely with IEC-6 cell proliferation and transformation induced by activated MEK1²⁰. As proposed previously, we believe that this 46-kDa band is in fact ERK1b, an alternatively spliced isoform of ERK1 which has recently been cloned and characterized by the group of Seger et al.⁹³⁻⁹⁴. Current experiments are in progress in the laboratory to understand the contribution of ERK1b variant in caMEK-induced intestinal epithelial cell transformation and EMT.

In summary, we have elucidated the consequences of expressing a constitutive activated mutant of MEK1 in normal intestinal epithelial cells. We have to mention that while this manuscript was in revision, Voisin et al. have also reporting that activation of MEK1 and

MEK2 is sufficient to fully transform intestinal epithelial cells and induce invasive and metastatic tumors ⁷⁵. Taken together, all these results confirm the importance of MEK signaling in intestinal tumorigenesis. Thus, MEK-ERK signaling may therefore represent an important target for developing new therapeutic approaches for treatment of colorectal cancer.

Acknowledgements

We thank Anne Vézina for technical assistance, Pierre Pothier for the critical reading of the manuscript and Dr J. Carrier for her help with nude mice. The osteopontin antibody developed by M. Solursh and A. Franzen was obtained from the Developmental Studies Hybridoma Bank developed under the auspices of the NICHD and maintained by the University of Iowa, Department of Biological Sciences, Iowa City, IA 52242. This research was supported by a grant from the Canadian Institutes of Health Research Grant to Nathalie Rivard (MT-14405). Sébastien Bergeron is a recipient of a post-doctoral fellowship from the Canadian Association of Gastroenterology/CIHR/CCFC. Nathalie Rivard is a recipient of a Canadian Research Chair in Signaling and Digestive Physiopathology.

Materials and Methods

Materials

The antibodies against total ERK, HA epitope, occludin, N-cadherin, GST, Fra-1, β -tubulin, c-fos and c-jun were from Santa Cruz Biotechnologies (Santa Cruz, CA). Antibodies recognizing phosphorylated ERK1/2 and total Egr-1 were obtained from Cell Signaling (Danvers, MA). Antibodies against E-cadherin were from BD Pharmingen (Mississauga, ON, Canada). The ZO-1 antibody was from Zymed Laboratories (Invitrogen, Burlington, ON, Canada). Antibodies recognizing β -actin and vimentin were purchased from Chemicon International (Billerica, MA). Osteopontin antibody was purchased from DSHB (Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa City, IA). MMP-2/MMP-9 inhibitor and U0126 were from Calbiochem-Novabiochem Corp. (San Diego, CA). The recombinant ERK2 protein was purchased from Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY, USA). For immunofluorescence, the goat anti-rabbit, goat anti-mouse AlexaFluoro488 FITC-labeled and the rabbit anti-rat IgG-FITC-labeled secondary antibodies were from Molecular Probes (Invitrogen). Other materials were obtained from Sigma-Aldrich unless stated otherwise.

Expression vectors

The expression vectors for HA-tagged wild-type MEK1 (wtMEK) and constitutively active MEK1 mutant (caMEK, in which the Raf1-dependent regulatory phosphorylation sites, S218 and S222, were substituted by aspartic residues)²⁸ were kindly provided by Dr J. Pouyssegur (Université de Nice, France). wtMEK and caMEK were subcloned into the retroviral expression vector pLXIN (Clontech) to produce viruses in HEK293T cells in co-transfection with helper amphotropic DNA vector as previously described²⁰.

Cell culture

The rat intestinal epithelial crypt cell line IEC-6 and IEC-6 cells stably overexpressing pLXIN empty vector (EV), wtMEK or caMEK were cultured as previously described^{6,20}. These cell populations were generated after viral infection of wtMEK and caMEK cloned in the retroviral vector pLXIN. The percentage of retrovirally transduced cells ranged between 70% and 80%, as estimated by parallel infections using viruses expressing the *Green Fluorescent Protein* gene product²⁰. The pLXIN retroviral vector co-expressed a

G418 resistance gene that allowed selection of pure populations of transduced cells within 10 days. The phenotype of these three cell lines was previously described²⁰. More specifically, the caMEK-expressing cells formed foci at post-confluency, in contrast to pLXIN- and wtMEK-expressing epithelioid cells which formed a monolayer of contact-inhibited cells²⁰. Foci from post-confluent caMEK-expressing cells were picked by aspiration with a pipet and pooled as one caMEK-expressing cell population. All the experiments were performed with this caMEK-expressing cell population in comparison to pLXIN and wtMEK-expressing cell populations. This strategy was repeated independently three times with other IEC-6 cell cultures and similar results were obtained with all caMEK-expressing cell populations. HT-1080 fibrosarcoma cells, obtained from ATCC (Manassas, VA, USA) and used as positive control in invasion assays, were cultured in DMEM containing 10% FCS. The colon carcinoma cell line HCT116 was obtained from ATCC (CCL-247) and cultured in McCoy's medium containing 10% FCS. The colon adenocarcinoma cell lines Lovo (CCL 229, ATCC) was cultured in Ham's F12 medium containing 10% FCS and the SW480 (CCL 228, ATCC) was cultured in DMEM containing 10% FBS. The colon adenocarcinoma cell line DLD-1 was obtained from Dr F. Boudreau (University of Sherbrooke, QC, Canada) and cultured in RPMI medium containing 10% FCS.

Protein expression and immunoblotting

Cells were lysed in SDS sample solution (62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 2.5% SDS, 10% glycerol, 5% β -mercaptoethanol, 0.02% bromophenol blue). Protein concentrations were measured using a modified Lowry procedure with bovine serum albumin as standard²⁹. Western blot analyses were performed as previously described²⁰.

MEK kinase assay

Cells were washed twice with ice-cold PBS, lysed in chilled lysis buffer (100 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1% Triton X-100, 1 mM PMSF, 0.2 mM orthovanadate, and 40 mM β -glycerophosphate) and lysates cleared of cellular debris by centrifugation. HA antibodies were added to 200 μ g of each cell lysate and incubated overnight at 4°C under agitation. Four mg of protein A-Sepharose (GE Healthcare Life

Science) were subsequently added for 1 h (4°C under agitation). Immunocomplexes were harvested by centrifugation and washed three times with ice-cold lysis buffer. Proteins were solubilized in Laemmli's buffer and separated by SDS-PAGE. In other experiments, the beads were washed three times with lysis buffer followed by two rinses in ice-cold kinase buffer (40 mM Hepes pH 7.4, 20 mM MgCl₂, 1 mM dithiothreitol) before performing the MEK kinase assay with 1 µg of recombinant ERK2 as substrate. Phosphorylation of ERK2 was revealed by Western blot with antibodies recognizing phosphorylated ERK1/2.

Immunofluorescence microscopy of cultured cells

Immunofluorescence experiments on cells grown on sterile glass coverslips were performed exactly as previously described²⁰. Negative controls (no primary antibody) were included in all experiments.

RNA extraction and Quantitative RT-PCR (qRT-PCR) analysis

Total RNA was isolated using the Totally RNA extraction kit (Ambion). RT-PCR analysis was performed using AMV-RT (Roche Diagnostics) according to the manufacturer's instructions. *Snail1* and *Snail2* expression: qPCR was performed using a LightCycler apparatus (Roche Diagnostics). Experiments were run and analyzed with the LightCycler software 4.0 according to manufacturer's recommendations. Synthesis of double stranded DNA during the PCR cycles was monitored with SYBR Green I (QuantiTect SYBR Green PCR Kit; Qiagen). All samples were run in triplicate. Target expression was quantified relatively to TATA-Binding Protein (TBP) expression. A standard calibration curve was prepared for each gene by using serial dilutions of the calibrator sample and crossing point values were plotted vs. the log of the relative concentration of each dilution. This standard curve was used to correct for differences in PCR efficiencies. Primers: rat *Snail1* forward: ATGAGGACAGTGGCAAAGC; r*Snail1* backward: TCGGATGTGCATCTTCAGAG. Primers: r*Snail2* forward: GCACTGTGATGCCAGTCTA; r*Snail2* backward: CAGTGAGGGCAAGAGAAAGG. Primers: human *Snail1* forward: CATCCTTCTCACTGCCATG; h*Snail1* backward: GTCTTCATCAAAGTCCTGTGG; h*Snail2* forward: ATGAGGAATCTGGCTGCTGT; h*Snail2* backward: CAGGAGAAAATGCCTTTGGA.

Generation of shRNAs against Egr-1 and Fra-1

The lentiviral shRNA expression vector (pLenti6-U6) was constructed by cloning the U6 promoter from pSilencer 2.0-U6 (Ambion) into pLenti6/V5-D-TOPO (Invitrogen). Briefly, the U6 promoter was amplified by PCR from pSilencer 2.0-U6 using the forward primer: CCA TCG ATC ATG ATT ACG AAT TGC AAC G (insertion of a ClaI site) and the reverse primer: GGC CAG TGC CAA GCT TG. The PCR product was digested by BamHI and ClaI and cloned into recirculated pLenti6/V5-D-TOPO between BamHI and ClaI sites that replaced the cytomegalovirus promoter. shRNA oligonucleotides were designed according to Ambion guidelines (technical bulletin no. 506) using the siRNA sequences GCA TCT GTT CCC CCT TGA TAT (shEgr-1) or GAA GTT CCA CCT TGT GGC AAG (shFra-1) and TTCAAGAGA as the loop sequence. The oligonucleotide-annealed product was subcloned into the pLenti6-U6 between BamHI and XhoI sites, giving rise to pLenti6-shEgr-1 and pLenti6-shFra-1. The control shRNA targeted the GFP sequence sequence was as following: GCC ACA ACG TCT ATA TCA TGG. Lentiviruses were produced and used for cell infection according to Invitrogen recommendations (ViraPower Lentiviral Expression System, instructions manual).

MT1-MMP, MMP2, MMP9, E-cadherin, osteopontin, uPA, COX-2, β -actin, α 6 integrin subunit and TBP expression

Aliquots of the diluted cDNA preparations were used as templates for PCR reactions with the primers. Reactions were performed using 1 unit of *Taq* DNA polymerase (Qiagen). Parameters for DNA amplification were 94°C for 45 s, annealing temperature (59°C) for 30 s, and 72°C for 45 s. Oligonucleotide primers used for DNA amplification were synthesized by Invitrogen. DNA amplification products were analyzed by gel electrophoresis on a 2% agarose gel stained with ethidium bromide. Primer sequences are available upon request.

Invasion assay

The invasion assay was performed by using 6-well BD Biocoat Matrigel invasion chambers with 8- μ m polycarbonated filters (Becton Dickinson, Bedford MA). 2.5×10^5 HT-1080 (positive control), wtMEK- and caMEK-expressing cells were seeded on 6-well Matrigel

invasion chamber plates in presence of 20 mM hydroxyurea, a pharmacological inhibitor of cellular ribonucleoside reductase in order to arrest the cell cycle in G1/S phase³⁰ and as we have previously done³¹; the cells were cultured in routine medium in presence or absence of specific inhibitors. Non migratory cells on the upper surface of the filter were removed by wiping with a cotton swab. Invasive cells that penetrated through pores and migrated to the underside of the membrane were stained with crystal violet (1%) solution after fixation with methanol.

MMP activation and production by zymography

Zymography was done according as described³². Cells were plated in 6-well plates in complete medium. Cells were serum-deprived for 24 h, after which medium samples were harvested and centrifuged at 2000 ×g for 10 min. After normalization for cell protein content from cell lysates, aliquots from medium samples were electrophoresed in 10% sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gels containing gelatin (0.1%) or β-casein (0.1%). After electrophoresis, the gels were washed twice for 15 min at room temperature in a buffer containing 2.5% Triton X-100, 50 mM Tris and 10 mM CaCl₂ pH 7.4, and incubated for 18 h in 50 mM Tris, 50 mM NaCl, 10 mM CaCl₂, pH 7.6, at 37 °C. Gels were then stained with Coomassie brilliant blue. Clear zones against the blue background indicated the presence of gelatinase or caseinase activity.

Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) assays

For ChIP assays, 10⁷ cells were cross-linked with 1% formaldehyde at room temperature for 15 min, and the reaction stopped by the addition of glycine to a final concentration of 0.125 mM. After washing twice with ice-cold PBS, cells were scraped off the plate, centrifuged and resuspended in 1ml of nucleus/Chromatin Preparation buffer [Triton X-100 0.25%, Hepes 10mM (pH 6.5), EDTA 10 mM, EGTA 0.5 mM, 0.5 µg/mL aprotinin, pepstatin (1µg/ml) and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)]. After incubation on ice for 10 min, cells were dounced to isolate nuclei. The nuclei were then collected, resuspended in 500µL nuclei lysis buffer [50 mM Tris-HCl (pH 8.1), 10 mM EDTA, 1% SDS, 0.5% NP40, 0.5 µg/mL aprotinin, pepstatin (1µg/ml) and 1 mM PMSF] and sonicated (5 pulses of 10 s) (sonicator: Branson Sonifier 250). After centrifugation, the supernatant was diluted 1:10

with immunoprecipitation dilution buffer [0.1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl (pH 8.1), 150 mM NaCl, 0.5 µg/mL aprotinin, pepstatin (1µg/ml) and 1 mM PMSF]. The resulting cell lysates were precleared with protein A-agarose beads and subjected to immunoprecipitation with 2 µg of anti-Egr-1 antibody, anti-Fra-1 antibody or anti-GST at 4°C overnight. Immunoprecipitated complexes were collected by adding salmon sperm DNA/protein A-agarose for 1 h at 4°C. Immunoprecipitates were initially washed twice with low salt buffer [2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl (pH 8.1), SDS 0.1%, Triton X-100 1% and 150 mM NaCl], then twice with high salt buffer [2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl (pH 8.1), SDS 0.1%, Triton X-100 1% and 500 mM NaCl] and twice again with LiCl buffer [1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl (pH 8.1), NP-40 1%, LiCl 250 mM and Deoxycholate 1%]; the DNA/protein complex was eluted twice using elution buffer (0.1M NaHCO₃, 1% SDS) and treated with RNase A for 30 min at 37°C. The protein/DNA cross-links were reversed by heating at 65°C for 16 h, and the DNA subsequently extracted using the QIAquick PCR purification kit (Qiagen). For PCR, 3 µL from a 50-µL DNA preparation were used for amplifications. Specific sequences of the rat Snail1 promoter in the immunoprecipitates were detected by PCR with primers forward 5'- CCTTGGGCTCCATTTACCTT -3' and reverse 5'- TGCCTGACTCCTGACCTGTT -3'. The resulting PCR product spans the -1380 to -1200 region that includes the putative Egr-1-binding sites. Specific sequences of the rat Snail2 promoter in the immunoprecipitates were detected by PCR with primers forward 5'- CACCGTAGCTTGGGAAGAAA -3' and reverse 5'-GGGGATGAGAAAATGGGAGT -3'. The resulting PCR product spans the region -450 to -650 that includes the two putative AP-1-binding sites.

Tumor growth in nude mice

A total of 2×10^6 cells suspended in 0.1 ml DMEM were injected into the dorsal subcutaneous tissue of 5-week-old female nude mice CD1 *nu/nu* (Charles River, Canada). Tumor volume was determined by external measurement according to published methods $(d^2 \times D)/2$ ³³.

Experimental metastasis

The tail vein of CD1 nu/nu mice (Charles River, Canada) was injected with 10^6 cells suspended in 100 μ l. Animals were sacrificed at any sign of respiratory distress or weight loss, or after 21 days and examined for the presence of lung metastases. Lungs were stained with Bouin's fluid.

Data presentation

Assays were performed in either duplicate or triplicate. Typical results shown are representative of 3 independent experiments. Densitometric analysis was performed by using Image J software. Results were analyzed by the Student's *t* test and were considered statistically significant at $p < 0.001$.

REFERENCES

1. Bos JL. Ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res* 1989; **49**: 4682-89 (Published erratum appears in *Cancer Res* 1990; 50:1352)
2. Malumbres M, Barbacid M. RAS oncogenes: the first 30 years. *Nat Rev Cancer* 2003; **3**: 459-65 (Published erratum in *Nat Rev Cancer* 2003; 3:708)
3. Garrington TP, Johnson GL. Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Curr Opin Cell Biol* 1999; **11**: 211-18
4. Treisman R. Regulation of transcription by MAP kinase cascades. *Curr Opin Cell Biol* 1996; **8**: 205-15
5. Rhoads JM, Argenzio RA, Chen W, Rippe RA, Westwick RA, Cox AD, Berschneider HM, Brenner DM. L-glutamine stimulates intestinal cell proliferation and activates mitogen-activated protein kinases. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 1997; **272**: G943-53
6. Rivard N, Boucher MJ, Asselin C, L'Allemain G. MAP kinase cascade is required for p27 downregulation and S phase entry in fibroblasts and epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 1999; **277**: C652-64
7. Jasleen J, Shimoda N, Shen ER, Tavakkolizadeh A, Whang EE, Jacobs DO, Zinner MJ, Ashley SW. Signalling mechanisms of glucagon-like peptide 2-induced intestinal epithelial cell proliferation. *J Surg Res* 2000; **90**: 13-8
8. Chiu T, Wu SS, Santiskulvong C, Tangkijvanich P, Yee HF Jr, Rozengurt E. Vasopressin-mediated mitogenic signalling in intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002; **282**: C434-50
9. Meloche S, Pouysségur J. The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1- to S-phase transition. *Oncogene* 2007; **26**: 3227-39
10. Aliaga JC, Deschênes C, Beaulieu JF, Calvo EL, Rivard N. Requirement of the MAP kinase cascade for cell cycle progression and differentiation of human intestinal cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 1999; **277**: G631-41
11. Davies H, Bignell GR, Cox C, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002; **417**: 949-54
12. Rajagopalan H, Bardelli A, Lengauer C, et al. RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status. *Nature* 2002; **418**: 934
13. Deng G, Bell I, Crawley S, et al. BRAF mutation is frequently present in sporadic colorectal cancer with methylated hMLH1, but not in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2004; **10**: 191-95
14. Lee SH, Lee JW, Soung YH, Kim SY, Nam SW, Park WS, Kim SH, Yoo NJ, Lee JY. Colorectal tumors frequently express phosphorylated mitogen-activated protein kinase. *APMIS* 2004; **112**: 233-38
15. Eggstein P, Franke M, Kutschka I, Manthey G, von Specht BU, Ruf G, Farthmann EH. Expression and activity of mitogen activated protein kinases in human colorectal carcinoma. *Gut* 1999; **44**: 834-38

16. Hoshino R, Chatani Y, Yamori T, Tsuruo T, Oka H, Yoshida O, Shimada Y, Ari-I S, Wada H, Fujimoto J, Kohno M. Constitutive activation of the 41-/43-kDa mitogen-activated protein kinase signaling pathway in human tumors. *Oncogene* 1999; 18: 813-22
17. Licato LL, Brenner DA. Analysis of signaling protein kinases in human colon or colorectal carcinomas. *Dig Dis Sci* 1998; 43: 1454-64
18. Kuno Y, Kondo K, Iwata H, Senga T, Akiyama S, Ito K, Takagi H, Hamaguchi M. Tumor-specific activation of mitogen-activated protein kinase in human colorectal and gastric carcinoma tissues. *Jpn J Cancer Res* 1998; 89: 903-09
19. Sebolt-Leopold JS, Dudley DT, Herrera R, Van Becelaere K, Wiland A, Gowan RC, Teclé H, Barrett SD, Bridges A, Przybranowski S, Leopold WR, Saltiel AR. Blockage of the MAP kinase pathway suppresses growth of colon tumors in vivo. *Nat Med* 1999; 5: 810-6
20. Boucher MJ, Jean D, Vézina A, Rivard N. Dual role of MEK/ERK signaling in senescence and transformation of intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 286: G736-46
21. Komatsu K, Buchanan FG, Katkuri S, Morrow JD, Inoue H, Otaka M, Watanabe S, DuBois RN. Oncogenic potential of MEK1 in rat intestinal epithelial cells is mediated via cyclooxygenase-2. *Gastroenterology* 2005; 129: 577-90
22. Lee JM, Dedhar S, Kalluri R, Thompson EW. The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. *J Cell Biol* 2006; 172: 973-81
23. Thiery J-P. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nature Rev* 2002; 2: 442-54
24. Baum B, Settleman J, Quinlan MP. Transitions between epithelial and mesenchymal states in development and disease. *Semin Cell Dev Biol* 2008; 19: 294-308
25. Fang JY, Richardson BC. The MAPK signalling pathways and colorectal cancer. *Lancet Oncol* 2005; 6: 322-27
26. Ahmed N, Oliva K, Wang Y, et al. Downregulation of urokinase plasminogen activator receptor expression inhibits Erk signalling with concomitant suppression of invasiveness due to loss of uPAR-beta1 integrin complex in colon cancer cells. *Br J Cancer* 2003; 9: 374-84
27. Zhang J, Anastasiadis PZ, Liu Y, et al. Protein kinase C (PKC) betaII induces cell invasion through a Ras/Mek-, PKC iota/Rac 1 dependent signaling pathway. *J Biol Chem* 2004; 279: 22118-123
28. Brunet A, Pagès G, Pouyssegur J. Constitutively active mutants of MAP kinase kinase (MEK1) induce growth factor-relaxation and oncogenicity when expressed in fibroblasts. *Oncogene* 1994; 9: 3379-87
29. Peterson GL. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal Biochem* 1977; 83: 346-56

30. Calzado MA, MacHo A, Lucena C, Munoz E. Hydroxyurea inhibits the transactivation of the HIV-long-terminal repeat (LTR) promoter. *Clin Exp Immunol* 2000; 120: 317-23
31. Tétreault MP, Chailier P, Beaulieu JF, Rivard N, Ménard D. Epidermal growth factor receptor-dependent PI3K-activation promotes restitution of wounded human gastric epithelial monolayers. *J Cell Physiol* 2008; 214: 545-57
32. Uzui H, Lee J-D, Shimizu H, Tsutani H, Ueda T. The role of protein-tyrosine phosphorylation and gelatinase production in the migration and proliferation of smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 2000; 149: 51-9
33. Wang J, Sun L, Myeroff L, Wang X, Gentry LE, Yang J, Liang J, Zborowska E, Markowitz S, Wilson JKV, Brattain MG. Demonstration that mutation of the type II transforming growth factor b receptor inactivates its tumor suppressor activity in replication error-positive colon carcinoma cells. *J Biol Chem* 1995; 270: 22044-49
34. Batlle E, Sancho E, Francí C, Domínguez D, Monfar M, Baulida J, García De Herreros A. The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat Cell Biol* 2000; 2: 84-9
35. Cano A, Pérez-Moreno MA, Rodrigo I, Locascio A, Blanco MJ, del Barrio MG, Portillo F, Nieto MA. The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol* 2000; 2: 76-83
36. Comijn J, Berx G, Vermassen P, Verschueren K, van Grunsven L, Bruyneel E, Mareel M, Huylebroeck D, van Roy F. The two-handed E box binding zinc finger protein SIP1 downregulates E-cadherin and induces invasion. *Mol Cell* 2001; 7: 1267-78
37. Perez-Moreno MA, Locascio A, Rodrigo I, Dhondt G, Portillo F, Nieto MA, Cano A. A new role for E12/E47 in the repression of E-cadherin expression and epithelial-mesenchymal transitions. *J Biol Chem* 2001; 276: 27424-31
38. Bolós V, Peinado H, Pérez-Moreno MA, Fraga MF, Esteller M, Cano A. The transcription factor Slug represses E-cadherin expression and induces epithelial to mesenchymal transitions: a comparison with Snail and E47 repressors. *J Cell Sci* 2003; 116: 499-511
39. Eger A, Aigner K, Sonderegger S, Dampier B, Oehler S, Schreiber M, Berx G, Cano A, Beug H, Foisner R. DeltaEF1 is a transcriptional repressor of E-cadherin and regulates epithelial plasticity in breast cancer cells. *Oncogene* 2005; 24: 2375-85
40. De Craene B, van Roy F, Berx G. Unraveling signalling cascades for the Snail family of transcription factors. *Cell Signal* 2005; 17: 535-47
41. Krishnamachary B, Zagzag D, Nagasawa H, Rainey K, Okuyama H, Baek JH, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor-1-dependent repression of E-cadherin in von Hippel-Lindau tumor suppressor-null renal cell carcinoma mediated by TCF3, ZFH1A, and ZFH1B. *Cancer Res* 2006; 66: 2725-31

42. Imamichi Y, König A, Gress T, Menke A. Collagen type I-induced Smad-interacting protein 1 expression downregulates E-cadherin in pancreatic cancer. *Oncogene* 2007; 26: 2381-85
43. Peinado H, Ballestar E, Esteller M, Cano A. Snail mediates E-cadherin repression by the recruitment of the Sin3A/histone deacetylase 1 (HDAC)/HDAC2 complex. *Mol Cell Biol* 2004; 24: 306-319
44. Snail and E47 repressors of E-cadherin induce distinct invasive and angiogenic properties in vivo. *J Cell Sci* 2004; 117: 2827-39
45. Grotegut S, von Schweinitz D, Christofori G, Lehembre F. Hepatocyte growth factor induces cell scattering through MAPK/Egr-1-mediated upregulation of Snail. *EMBO J* 2006; 25: 3534-45
46. Sukhatme VP, Cao XM, Chang LC, Tsai-Morris CH, Stamenkovich D, Ferreira PC, Cohen DR, Edwards SA, Shows TB, Curran T, et al. A zinc finger-encoding gene coregulated with c-fos during growth and differentiation, and after cellular depolarization. *Cell* 1988; 53: 37-43
47. Andreolas C, Kalogeropoulou M, Voulgari A, Pintzas A. Fra-1 regulates vimentin during Ha-RAS-induced epithelial mesenchymal transition in human colon carcinoma cells. *Int J Cancer* 2008; 122: 1745-56
48. Birkedal-Hansen H, Yamada S, Windsor J, Poulsen AH, Lyons G, Stetler-Stevenson W, Birkedal-Hansen B. Matrix metalloproteinases. *Curr Protoc Cell Biol* 2003; 10:Unit 10.8
49. Hoffman RM. Visualization of GFP-expressing tumors and metastasis in vivo. *Biotechniques* 2001; 30: 1016-26
50. Eisinger AL, Prescott SM, Jones DA, Stafforini DM. The role of cyclooxygenase-2 and prostaglandins in colon cancer. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2007; 82: 147-54
51. Agrawal D, Chen T, Irby R, Quackenbush J, Chambers AF, Szabo M, Cantor A, Coppola D, Yeatman TJ. Osteopontin identified as colon cancer tumor progression marker. *C R Biol* 2003; 326: 1041-43
52. Irby RB, McCarthy SM, Yeatman TJ. Osteopontin regulates multiple functions contributing to human colon cancer development and progression. *Clin Exp Metastasis* 2004; 21: 515-23
53. Andreasen PA, Kjøller L, Christensen L, Duffy MJ. The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: a review. *Int J Cancer* 1997; 72: 1-22
Enns A, Gassmann P, Schlueter K, Korb T, Spiegel HU, Senninger B, Mitjans F, Haier J. Integrins can directly mediate metastatic tumor cell adhesion within liver sinusoids. *J Gastrointest Surg* 2004; 8: 1049-60
54. Berx G, Raspé E, Christofori G, Thiery JP, Sleeman JP. Pre-EMTing metastasis? Recapitulation of morphogenetic processes in cancer. *Clin Exp Metastasis* 2007; 24: 587-97

55. Guarino M, Rubino B, Ballabio G. The role of epithelial-mesenchymal transition in cancer pathology. *Pathology* 2007; 39:305-18
56. Peinado H, Portillo F, Cano A. Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis. *Int J Dev Biol* 2004; 48: 365-75
57. Thiel G, Cibelli G. Regulation of life and death by the zinc finger transcription factor Egr-1. *J Cell Physiol* 2002; 193: 287-92
58. Zhao D, Zhan Y, Zeng H, Koon HW, Moyer MP, Pothoulakis C. Neurotensin stimulates expression of early growth response gene-1 and EGF receptor through MAP kinase activation in human colonic epithelial cells. *Int J Cancer* 2007; 120:1652-56
59. Chen A, Xu J, Johnson AC. Curcumin inhibits human colon cancer cell growth by suppressing gene expression of epidermal growth factor receptor through reducing the activity of the transcription factor Egr-1. *Oncogene* 2006; 25: 278-87
60. Balmanno K, Cook, SJ. Sustained MAP kinase activation is required for the expression of cyclin D1, p21Cip1 and a subset of AP-1 proteins in CCL39 cells. *Oncogene* 1999; 18: 3085-97
61. Mechta F, Lallemand D, Pfarr CM, Yaniv M. Transformation by ras modifies AP1 composition and activity. *Oncogene* 1997; 14: 837-47
62. Treinies I, Paterson H F, Hooper S, Wilson R, Marshall CJ. Activated MEK stimulates expression of AP-1 components independently of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-kinase) but requires a PI3-kinase signal to stimulate DNA synthesis. *Mol Cell Biol* 1999; 19: 321-29
63. Vial E, Marshall CJ. ERK-MAP kinase activity protects the FOS family member Fra-1 against proteasomal degradation in colon carcinoma cells. *J Cell Sci* 2003; 116: 4957-63
64. Pollock CB, Shirasawa S, Sasazuki T, Kolch W, Dhillon AS. Oncogenic K-RAS is required to maintain changes in cytoskeletal organization, adhesion, and motility in colon cancer cells. *Cancer Res* 2005; 65:1244-50
65. Barker N, Clevers H. Tumor environment: a potent driving force in colorectal cancer? *Trends Mol Med* 2001; 7: 535-37
66. Alfonso P, Nunez A, Madoz-Gurpide J, Lombardia L, Sanchez L, Casal JI. Proteomic expression analysis of colorectal cancer by two-dimensional differential gel electrophoresis. *Proteomics* 2005; 5: 2602-11
67. Peinado H, Quintanilla M, Cano A. Transforming growth factor beta-1 induces snail transcription factor in epithelial cell lines: mechanisms for epithelial mesenchymal transitions. *J Biol Chem* 2003; 278: 21113-23
68. Barberà MJ, Puig I, Domínguez D, Julien-Grille S, Guaita-Esteruelas S, Peiró S, Baulida J, Francí C, Dedhar S, Larue L, García de Herreros A. Regulation of Snail transcription during epithelial to mesenchymal transition of tumor cells. *Oncogene* 2004; 23: 7345-54

69. Jhawer M, Goel S, Wilson AJ, Montagna C, Ling YH, Byun DS, Nasser S, Arango D, Shin J, Klampfer L, Augenlicht LH, Perez-Soler R et al. PIK3CA mutation/PTEN expression status predicts response of colon cancer cells to the epidermal growth factor receptor inhibitor cetuximab. *Cancer Res* 2008; 68: 1953-61. Erratum in: *Cancer Res* 2008; 68(16): 6859.
70. Larue L, Bellacosa A. Epithelial-mesenchymal transition in development and cancer: role of phosphatidylinositol 3' kinase/AKT pathways. *Oncogene* 2005; 24: 7443-54
71. Matsuzaki K, Okazaki K. Transforming growth factor-beta during carcinogenesis: the shift from epithelial to mesenchymal signaling. *J Gastroenterol* 2006; 41: 295-303
72. Chen J. Is Src the key to understanding metastasis and developing new treatments for colon cancer? *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2008; 5: 306-7
73. Sarkar FH, Li Y, Wang Z, Kong D. NF-kappaB signaling pathway and its therapeutic implications in human diseases. *Int Rev Immunol* 2008; 27: 293-319
74. Voisin L, Julien C, Duhamel S, Gopalbhai K, Claveau I, Saba-El-Leil MK, Rodrigue-Gervais IG, Gaboury L, Lamarre D, Basik M, Meloche S. Activation of MEK1 or MEK2 isoform is sufficient to fully transform intestinal epithelial cells and induce the formation of metastatic tumors. *BMC Cancer* 2008; 8: 337-53
75. Schramek H, Feifel E, Healy E, Pollack V. Constitutively active mutant of the mitogen-activated protein kinase kinase MEK1 induces epithelial dedifferentiation and growth inhibition in madin-darby canine kidney-C7 cells. *J Biol Chem* 1997; 272: 11426-33
76. Montesano R, Soriano JV, Hosseini G, Pepper MS, Schramek H. Constitutively active mitogen-activated protein kinase kinase MEK1 disrupts morphogenesis and induces an invasive phenotype in Madin-Darby canine kidney epithelial cells. *Cell Growth Differ* 1999; 10: 317-32
77. Schramek H, Feifel E, Marschitz I, Golochtchapova N, Gstraunthaler G, Montesano R. Loss of active MEK1-ERK1/2 restores epithelial phenotype and morphogenesis in transdifferentiated MDCK cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2003; 285: C652-61.
78. Chen L, Necela BM, Su W, Yanagisawa M, Anastasiadis PZ, Fields AP, Thompson EA. Peroxisome proliferator-activated receptor γ promotes epithelial to mesenchymal transformation by Rho GTPase-dependent activation of ERK1/2. *J Biol Chem* 2006; 281:24575-87
79. Woodhouse EC, Chuaqui RF, Liotta LA. General mechanisms of metastasis. *Cancer* 1997; 80: 1529-37
80. Reddy KB, Nabha SM, Atanaskova N. Role of MAP kinase in tumor progression and invasion. *Cancer Metastasis Rev* 2003; 22: 395-403
81. Sivaraman VS, Wang H, Nuovo GJ, Malbon CC. Hyperexpression of mitogen-activated protein kinase in human breast cancer. *J Clin Invest* 1997; 99: 1478-83

82. Coutts AS, Murphy LC. Elevated mitogen-activated protein kinase activity in estrogen-nonresponsive human breast cancer cells. *Cancer Res* 1998; 58: 4071-74
83. McCawley LJ, Li S, Wattenberg EV, Hudson LG. Sustained activation of the mitogen-activated protein kinase pathway. A mechanism underlying receptor tyrosine kinase specificity for matrix metalloproteinase-9 induction and cell migration. *J Biol Chem* 1999; 274: 4347-53
84. Adeyinka A, Nui Y, Cherlet T, Snell L, Watson PH, Murphy LC. Activated mitogen-activated protein kinase expression during human breast tumorigenesis and breast cancer progression. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 1747-53
85. Enns A, Korb T, Schlueter K, Gassmann P, Spiegel HU, Senninger B, Mitjans F, Haier J. $\alpha\beta 5$ Integrins mediate early step of metastasis formation. *Eur J Cancer* 2005; 41: 1065-72
86. Komatsu K, Buchanan FG, Otaka M, Jin M, Odashima M, Horikawa Y, Watanabe S, Dubois RN. Gene expression profiling following constitutive activation of MEK1 and transformation of rat intestinal epithelial cells. *Mol Cancer* 2006; 5: 63
87. Xu R, Zhou B, Fung PC, Li X. Recent advances in the treatment of colon cancer. *Histol Histopathol* 2006; 21: 867-72
88. Brunet A, Pagès G, Pouyssegur J. Growth factor-stimulated MAP kinase induces rapid retrophosphorylation and inhibition of MAP kinase kinase (MEK1). *FEBS Lett* 1994; 346: 299-303
89. Brondello JM, Brunet A, Pouyssegur J, McKenzie FR. The dual specificity mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 and -2 are induced by the p42/p44MAPK cascade. *J Biol Chem* 1997; 272: 1368-76
90. Gopalbhai K, Meloche S. Repression of mitogen-activated protein kinases ERK1/ERK2 activity by a protein tyrosine phosphatase in rat fibroblasts transformed by upstream oncoproteins. *J Cell Physiol* 1998; 174: 35-47
91. Pouyssegur J, Volmat V, Lenormand P. Fidelity and spatio-temporal control in MAP kinase (ERKs) signalling. *Biochemical Pharmacol* 2002; 64: 755-63
92. Yung Y, Yao Z, Aebersold DM, Hanoch T, Seger R. Altered regulation of ERK1b by MEK1 and PTP-SL and modified Elk1 phosphorylation by ERK1b are caused by abrogation of the regulatory C-terminal sequence of ERKs. *J Biol Chem* 2001; 276: 35280-89
93. Yung Y, Yao Z, Hanoch T, Seger R. ERK1b, a 46-kDa ERK isoform that is differentially regulated by MEK. *J Biol Chem* 2000; 275: 15799-808

Manuscrit 3. The serine protease inhibitor serpinE2 is a novel target of ERK signaling involved in human colorectal tumorigenesis.

Sébastien Bergeron¹, Etienne Lemieux¹, Véronique Durand¹, Sébastien Cagnol¹, Julie C Carrier², Jacques G Lussier³, Marie-Josée Boucher² and Nathalie Rivard¹

¹ Department of Anatomy and Cellular Biology, CIHR Team on Digestive Epithelium, Faculty of Medicine and Health Sciences, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada.

² Service of Gastroenterology, Department of Medicine, Faculty of Medicine and Health Sciences, Université de She rbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada.

³ Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, St-Hyacinthe, Québec, Canada.

Statut de l'article : Publié - Molecular Cancer. 2010 Oct 13; 9:271

Avant-propos

Dans notre précédente étude (Manuscrit 2), nous avons démontré que l'expression d'un mutant constitutif actif de MEK1 dans les cellules IEC-6 est suffisante pour induire la transformation cellulaire associée à une transition épithélio-mésenchymateuse. Ces cellules ont acquis un caractère tumorigénique, notamment par leur capacité à croître en agarose mou ainsi qu'à former des tumeurs et des métastases lorsqu'injectées chez la souris immunodéficente. Dans le but de mieux comprendre les mécanismes moléculaires par lesquels la forme active de MEK1 induit la tumorigénèse intestinale, une analyse comparative par micro-puce d'ADN a été effectuée. Le gène encodant pour la *serpinE2* (*Serpin clade E member 2*), un inhibiteur de protéase à sérine, est l'une des cibles les plus fortement induites dans les cellules IEC-6 transformées par la forme active de MEK1 en comparaison aux cellules contrôles exprimant le MEK1 sauvage.

Contribution

Marie-Josée Boucher a effectué les analyses de la micropuce à ADN. Véronique

Durant a effectué les premiers RT-PCR et immunobuvardages démontrant l'induction de la serpineE2 par caMEK1 et KRAS (Fig.1A, B, D et E). Sébastien Cagnol a généré le modèle IEC-6 inductible pour l'expression de BRAF (Fig.1C). Sébastien Bergeron a effectué les analyses moléculaires et généré les shRNA dirigés contre la serpineE2. Sébastien Bergeron a également effectué les analyses de qPCR sur les tumeurs colorectales humaines et les lignées cellulaires de CRCs humaines (Fig.3A et 6). Sébastien Bergeron et moi avons caractérisé le phénotype des populations cellulaires infectées avec le shserpineE2 (Fig. 2, 4 et 6). Finalement, Sébastien Bergeron a écrit la première version du manuscrit. Pour le reste, j'ai participé à la conception de l'étude et effectué plusieurs analyses de qPCR quantitatif (Fig.3B et 4A). Nathalie Rivard a participé et coordonné la conception de l'étude ainsi que la rédaction du manuscrit.

Résumé

Des analyses de RT-PCR et d'immunobuvardages confirment que l'expression et la sécrétion de la serpinE2 sont augmentées par l'expression des formes oncogéniques de KRAS, BRAF et MEK1. De la même façon, l'expression de la serpinE2 est augmentée dans les cellules CRC possédant des mutations dans les gènes encodant pour KRAS et BRAF. L'utilisation d'un inhibiteur pharmacologique de MEK1/2 (U0126) réduit fortement l'expression de la serpinE2, ce qui montre la dépendance de l'activation oncogénique du sentier MEK/ERK dans la régulation de l'expression de cette protéase. L'utilisation d'ARN interférents dirigés contre la serpineE2 dans les cellules IEC-6 MEKca et dans les cellules CRC humaines, réduit leurs capacités de migration, à former de foyers cellulaires, à croître en indépendance d'ancrage et à former des tumeurs chez la souris immunodéficiente. De manière intéressante, l'analyse par qPCR montre l'augmentation des transcrits de la serpineE2 dans les adénomes et les tumeurs humaines en comparaison avec le tissu sain adjacent. Ces résultats démontrent donc que l'induction de la serpineE2 contribue à l'action oncogénique de la voie RAS/ERK MAP kinase dans les cellules de l'épithélium intestinal. Cette étude est la première à analyser l'implication de la serpinE2 dans le cancer du côlon et à l'identifier comme une nouvelle cible thérapeutique potentielle.

Abstract

Among the most harmful of all genetic abnormalities that appear in colorectal cancer (CRC) development are mutations of KRAS and its downstream effector BRAF as they result in abnormal extracellular signal-related kinase (ERK) signaling. In a previous report, we had shown that expression of a constitutive active mutant of MEK1 (caMEK) in normal rat intestinal epithelial cells (IECs) induced morphological transformation associated with epithelial to mesenchymal transition, growth in soft agar, invasion and metastases in nude mice. Results from microarrays comparing control to caMEK-expressing IECs identified the gene encoding for serpinE2, a serine protease inhibitor, as a potential target of activated MEK1. **Results,** 1- RT-PCR and western blot analyses confirmed the strong up-regulation of serpinE2 expression and secretion by IECs expressing oncogenic MEK, Ras or BRAF. 2- Interestingly, serpinE2 mRNA and protein were also markedly enhanced in human CRC cells exhibiting mutation in *KRAS* and *BRAF*. 3- RNAi directed against serpinE2 in caMEK-transformed rat IECs or in human CRC cell lines HCT116 and LoVo markedly decreased foci formation, anchorage-independent growth in soft agarose, cell migration and tumor formation in nude mice. 4- Treatment of CRC cell lines with U0126 markedly reduced *serpinE2* mRNA levels, indicating that expression of *serpinE2* is likely dependent of ERK activity. 5- Finally, Q-PCR analyses demonstrated that mRNA levels of serpinE2 were markedly increased in human adenomas in comparison to healthy adjacent tissues and in colorectal tumors, regardless of tumor stage and grade. **Conclusions.** Our data indicate that serpinE2 is up-regulated by oncogenic activation of Ras, BRAF and MEK1 and contributes to pro-neoplastic actions of ERK signaling in intestinal epithelial cells. Hence, serpinE2 may be a potential therapeutic target for colorectal cancer treatment.

Background

Colorectal cancer (CRC) is the second leading cause of cancer-related deaths in North America. Number of genetic and epigenetic alterations has been reported to be involved in colorectal tumorigenesis, such as chromosome instability, DNA methylation, gene amplification and mutation. *APC* is the most frequently mutated gene (53.8%), followed by TP53 (37.2%) and the two members of the MAPK

pathway, KRAS (35.1%) and BRAF (10%) [1]. In this regard, aberrant activation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway leads to the downstream activation of MEK1/2 and ERK1/2 kinases, which may control many features of tumorigenesis [2]. In keeping with this observation, we and others have recently shown that expression of constitutively active MEK1 in non-transformed rodent intestinal epithelial crypt cell lines is sufficient to induce growth factor relaxation for DNA synthesis and to promote morphological transformation and growth in soft agar [3,4]. Accordingly, it has been demonstrated that MEK is phosphorylated and activated in 30-40% of adenomas and in 76% of colorectal tumors [5,6]. CRCs also exhibit particularly high frequencies of ERK activation [7] and some studies have reported that ERK1/2 activities are indeed elevated in intestinal tumors [8,9]. Therefore, much emphasis has been placed on treatment strategies that target this protein kinase cascade [10]. In particular, potent and selective inhibitors of MEK1 and MEK2 have been developed and have been tested in phase I/II clinical trials (AZD6244, XL51, and ARRY-162) [11,12]. Interestingly, an early study reported that the enzymatic activity of ERK1/ERK2 is markedly up-regulated during late progression of carcinogen-induced colon carcinomas [13]. In this respect, activation of MEK1 and MEK2 in intestinal epithelial cells is sufficient to induce invasive and metastatic tumors in nude mice [14,15]. Together, these observations strengthen the notion that ERK1/2 MAP kinase signaling may play a critical role in CRC progression [16]. However, in spite of the obvious role of MEK/ERK kinases in the induction and regulation of intestinal epithelial cell transformation, tumorigenesis and metastasis, little is known regarding the molecular mechanism by which MEK/ERK signaling achieves such functions.

In order to further understand the mechanisms by which activated MEK1 induces tumorigenesis in intestinal epithelial cells, we have analyzed by microarray the pattern of gene expression in intestinal epithelial (IEC-6) cells overexpressing activated MEK1. Importantly, *Serpin clade E member 2 (SerpinE2)*, emerges as the highest up-regulated gene induced by activated MEK1. Serpins are SERine Protease INhibitors targeting proteases prostatic, matriptase [20], T cell proteinase-1 [21], trypsin, thrombin, plasmin and plasminogen activator [22,23]. Through their ability to

reduce proteolysis, serpins are predicted to impair extracellular matrix degradation and consequently cancer cell invasion and metastasis. However, serpinE1 (or plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1) has been reported to promote angiogenesis and to induce tumor cell migration [24-26] while serpinE2 (or protease nexin-1, PN-1) appears to enhance the invasive potential of pancreatic [27], breast [28] and lung cancer cells [29]. Furthermore, serpinE1 is overexpressed in highly aggressive human breast tumors while serpinE2 levels are elevated in pancreatic tumors [27], breast tumors [28], oral squamous carcinomas [30], liposarcomas [31] and more recently CRCs [32].

In the present study, we show that RNA interference (RNAi) targeting *serpinE2* in MEK1-transformed rat IECs or in human colorectal cancer cells decreased anchorage independent growth, migration and tumor formation in nude mice. Furthermore, serpinE2 is overexpressed in human adenomas and colorectal tumors compared to the adjacent healthy tissues. Therefore, our results demonstrate an important role for serpinE2 in colorectal tumorigenesis.

Results

SerpinE2 is overexpressed in intestinal epithelial cells transformed by activated MEK1 and oncogenic RAS and BRAF.

Among the most harmful of all genetic abnormalities that appear in CRC development are mutations of KRAS and its downstream effector BRAF as they result in abnormal ERK signaling. In a previous report, we had shown that expression of a constitutive active mutant of MEK1 (caMEK) in the intestinal epithelial cell line IEC-6 induced morphological transformation and growth in soft agar; in marked contrast, wtMEK overexpression had no effect on IEC-6 phenotype [3]. In order to understand the mechanisms by which activated MEK1 induces intestinal cell tumorigenesis, the pattern of gene expression was analyzed by microarray in IEC-6 cells overexpressing activated MEK1. Results from microarrays comparing control (wtMEK) to caMEK-expressing IEC-6 cells identified the *Serpin clade E member 2*

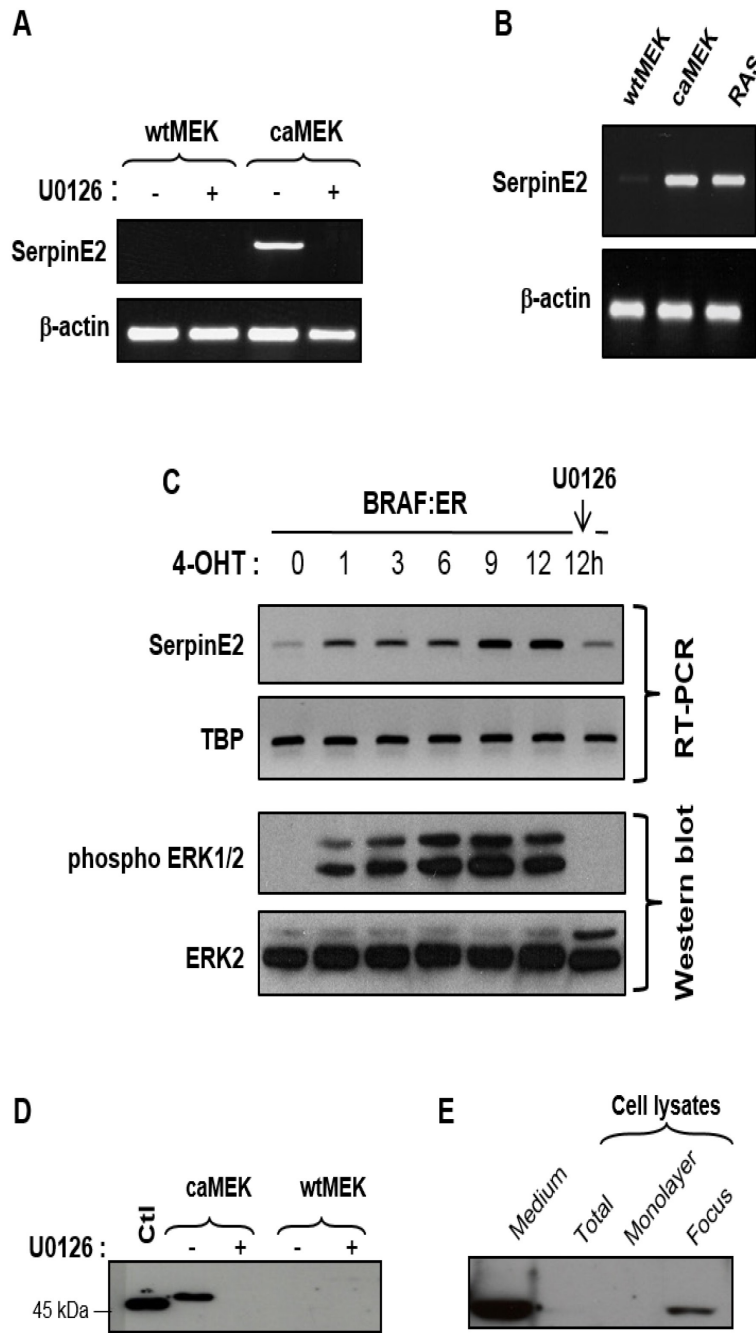


Figure 1. SerpinE2 is overexpressed in intestinal epithelial cells transformed by oncogenic MEK1, RAS and BRAF. **A-** wtMEK- and caMEK-expressing IECs were treated or not with U0126 (20 μ M) during 24h. Thereafter, cells were lysed and RNA isolated for *serpinE2* or β -actin gene expression by RT-PCR. **B-** IEC-6 expressing oncogenic RAS or wtMEK or caMEK were lysed and RNA isolated for *serpinE2* or β -actin gene expression by RT-PCR. **C-** BRAF:ER cells were stimulated with 250 nM 4-hydroxy-tamoxifen (4-OHT) for the indicated time periods. Thereafter, cells were lysed and RNA isolated for *serpinE2* or *TATA-binding protein* (TBP) gene expression by RT-

PCR. For the 12h time point, cells were also treated with 20 μ M U0126. ERK1/2 phosphorylation levels and total ERK1/2 were monitored by Western blot. **D-** wtMEK- and caMEK-expressing cells were treated or not with U0126 (20 μ M) during 24h. Thereafter, equal amounts of concentrated culture medium from wtMEK- and caMEK-expressing cells were analyzed by Western blotting with specific antibodies against serpinE2 as described in Material and Methods. Bovine follicular fluid was used as a positive control (CTL). **E-** caMEK-expressing IECs were cultured at post-confluence, lysed in Laemmli buffer and analyzed by Western blotting with specific antibodies against serpinE2 (lane 2). The culture medium was concentrated

and also analyzed by Western blotting for serpinE2 expression (lane 1). In some experiments, foci were harvested by aspiration with a pipet, lysed in Laemmli buffer (lane 4) and analyzed by Western blotting for the expression of serpinE2. The surrounding cells (monolayer, lane 3) were also lysed in Laemmli buffer for Western blotting with specific antibodies against serpinE2 (*serpinE2* or *PN-1*) gene as a potential target of activated MEK1. Indeed, *serpinE2* expression was significantly induced by more than 28-fold ($p < 0.05$) in cells overexpressing activated MEK1 in comparison to cells expressing wtMEK (data not shown). Overexpression of *serpinE2* in caMEK-expressing IECs was furthermore confirmed following RT-PCR analysis as shown in Fig. 1A. SerpinE2 expression was also markedly enhanced in IEC-6 cells transformed by oncogenic RAS (26-fold) or BRAF (12-fold after 12h of 4-hydroxytamoxifen (4-OHT)) (Fig. 1B and C).

Of note, the induction of serpinE2 was induced within 1h following ERK activation as observed in cells expressing the inducible BRAF:ER fusion protein stimulated with 4-OHT (Fig.1C). Treatment with the MEK-inhibitor U0126 completely abrogated serpinE2 gene expression induced by oncogenic MEK1 (Fig.1A) and BRAF (Fig.1C), indicating that induction of serpinE2 is an early and direct event occurring following the activation of ERK signaling.

Since serpinE2 protein is known to be secreted [22,33], we easily confirmed its presence in conditioned culture medium of caMEK-expressing IECs whereas no serpinE2 protein was detected in the culture medium of wtMEK-expressing or parental IECs (Fig. 1D). Again, treatment with the MEK-inhibitor U0126 completely abrogated serpinE2 secretion (Fig. 1D). Interestingly, serpinE2 protein was difficult to detect in total cell lysates (Fig.1E, lane 2). However, serpinE2 was easily observed in lysates prepared from foci of post-confluent caMEK-expressing cells (Fig.1E, lane 4), while it was not detectable in the surrounding monolayer (Fig.1E, lane 3). This indicates a stronger expression of serpinE2 protein by the transformed IECs forming the foci.

Gene silencing of serpinE2 decreases foci formation, growth in soft agarose and migration induced by activated MEK.

In order to determine the contribution of serpinE2 in intestinal transformation induced by activated MEK, foci from post-confluent caMEK-expressing IECs were

retrieved by aspiration with a pipette and pooled as one caMEK-expressing cell population. All further experiments were performed with this previously characterized caMEK-expressing IEC population [14] and compared with wtMEK-expressing cell populations. Recombinant lentiviruses encoding anti-*serpinE2* short hairpin RNA (shRNA) were therefore developed to stably suppress *serpinE2* levels in these cells. Several lentiviral constructs were generated and tested for their ability to knock down *serpinE2* protein. One of these viral shRNAs was selected and designated as shSerpine2. caMEK-expressing cells were henceforth infected with shSerpine2 lentiviruses or with lentiviruses expressing a control shRNA (shScrambled). Secretion of *serpinE2* protein was analyzed 14 days after selection with blasticidin S in these populations. As shown in Fig. 2A, secreted *serpinE2* levels were markedly reduced (>60%) in cells-expressing shSerpine2; in contrast, shScrambled had no effect on the secretion of *serpinE2* (data not shown).

To determine the functional role of *serpinE2* in caMEK-expressing cells, the proliferation rate of these cell populations was assessed when cultured on plastic. No difference was observed in the proliferation rate of subconfluent caMEK-expressing cells when *serpinE2* expression was downregulated (Fig.2B). In a previous study, we had shown that expression of activated MEK in intestinal epithelial cells resulted in loss of cell-cell contact growth inhibition and produced colonies or multilayered domes which grew to increased saturation density and formed tumors when transplanted into nude mice [14]. Of note, focus formation assays performed herein revealed that initially, there was little difference in the number of foci obtained between control cells and *serpinE2*-depleted cells (data not shown). However, *serpinE2* silencing markedly reduced the size of foci (Fig.2C) suggesting a reduced capacity of these foci to grow. Indeed, phase-contrast microscopy revealed that the colonies were smaller when *serpinE2* was downregulated (Fig.2D). Finally, expression of shSerpine2 led to a significant decrease in the ability of caMEK-expressing cells to grow under anchorage-independent conditions in soft agarose (Fig.2E).

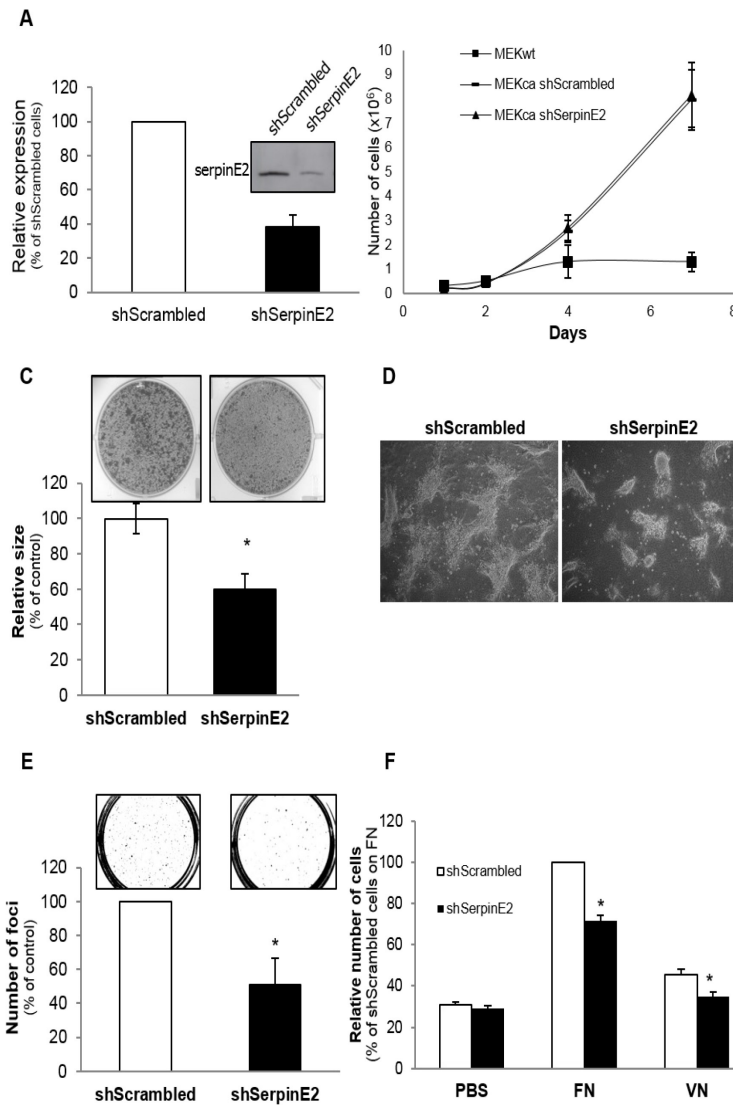


Figure 2. SerpinE2 silencing in caMEK-expressing IECs decreases foci formation, growth in soft agar and migration. **A-** caMEK-expressing IECs were stably infected with lentiviruses encoding for a control shRNA (scrambled sequence) or encoding a serpinE2-specific shRNA. These stable cell populations were thereafter lysed at confluence and equal amounts of concentrated culture medium were analyzed by Western blotting with specific antibodies against serpinE2. The graph illustrates densitometric analysis performed with the western blot data shown on the left to determine the % of serpinE2 downregulation. The level of serpinE2

observed in shScrambled cells was set at 100%. A representative experiment of three independent experiments is shown. **B-** wtMEK/IEC-6 or caMEK/IEC-6 cells expressing either shScrambled or shSerpinE2 were seeded in a 6-well plate at 100 000 cells per well. Cells were harvested and counted. Values are means of 4 experiments \pm SE. **C and D-** caMEK-transformed cells expressing or not shSerpinE2 were seeded on parental IEC-6 cell monolayer during 15 days. Thereafter, the cells were stained with crystal violet and images of colonies were acquired under light microscopy. The size of the foci was calculated using Image J software and expressed as % of shScrambled cells (control) which was set at 100%. **E-** Cells were cultured in soft agarose for 3 weeks before MTT. The number of colonies was determined using Image J software and expressed as % of shScrambled cells (control) set at 100%. **F-** Cell migration to the undersurface of the polycarbonate membrane of Boyden chambers coated with fibronectin (FN) or vitronectin (VN) was evaluated 24 h after seeding, in presence of 20 mM hydroxyurea. Values were expressed as a % of shScrambled cells migrating on fibronectin. *, significantly different from shScrambled cells at $p < 0.05$ (Student's *t* test).

Cell migration is an important process of tumorigenesis and metastasis. Moreover, we recently reported that intestinal epithelial cells expressing activated MEK1 clearly acquire an increased capacity to migrate as compared to wtMEK-expressing cells [14]. Herein, in an *in vitro* transwell migration assay, serpinE2 deficiency significantly reduced caMEK-expressing IEC migration to the undersurface of the polycarbonate membrane of Boyden chambers coated with fibronectin or vitronectin (Fig.2F), two extracellular matrix proteins which can interact with serpinE2 [34,35]. Taken together, these results support a role of serpinE2 in MEK1-induced transformation whereby serpinE2 activates anchorage-independent growth and cell migration.

Expression of serpinE2 in colorectal cancer cells is dependent on MEK/ERK activity

To assess the contribution of serpinE2 in human colorectal cancer, serpinE2 expression was first examined in various CRC cell lines including Caco-2/15 as well as others exhibiting mutation in KRAS (HCT-116, DLD-1, LoVo, SW480, T84) or BRAF (Colo-205, HT-29) [36]. As shown in Fig. 3A, serpinE2 mRNA levels were barely detectable in the Caco-2/15 cell line while being markedly expressed in all other CRC cell lines tested. Two human CRC cell lines, namely HCT116 and LoVo, which have an activating mutation in the KRAS gene resulting in elevated MEK/ERK activities [37], were thereby chosen to further analyze the regulation and role of serpinE2 expression in human colorectal cancer cells. In addition, the impact of U0126 treatment was also investigated to evaluate the contribution of endogenous MEK/ERK activities in serpinE2 expression in human cell models. Forty-eight-hour treatment of HCT116 and LoVo cell lines with U0126 efficiently blocked endogenous MEK activity as confirmed by the marked inhibition of ERK1/2 phosphorylation (data not shown) [14]. As shown in Fig. 3B, treatment of these CRC cell lines with U0126 markedly and significantly reduced serpinE2 mRNA levels, indicating that expression of serpinE2 is likely dependent of ERK activity in these cell lines.

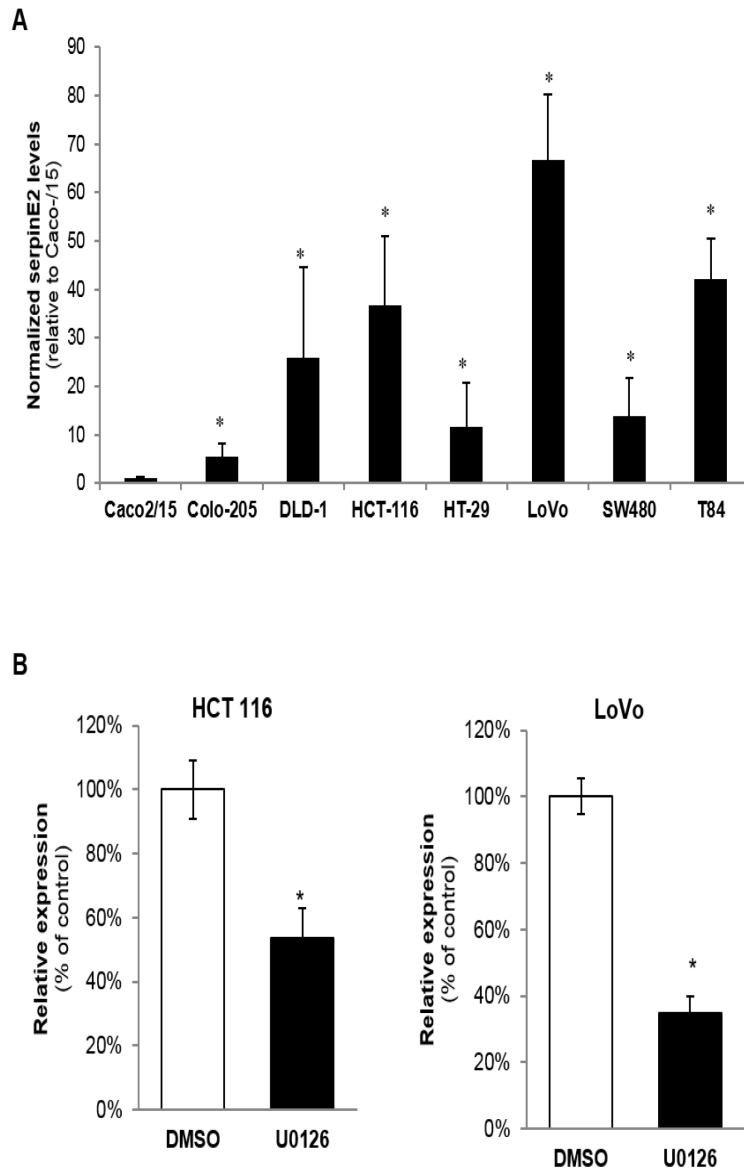


Figure 3. Expression of serpinE2 in colorectal cancer cells is dependent on MEK/ERK activation.

A- Total RNA was isolated from CRC cell lines and processed for Q-PCR to analyze *serpinE2* gene expression as described in Material and Methods. The relative level of each RNA was calculated using the standard curve method and normalized to the corresponding β 2MIC RNA level. *, significantly different from Caco-2/15 (set at 1) at $p < 0.01$ (Student's *t* test). **B-** HCT116 and LoVo cells were treated daily with U0126. After two days, cells were lysed and total RNA was isolated for Q-PCR for *serpinE2* gene expression. The relative level of each RNA was calculated using the standard curve method

and normalized to the corresponding β 2MIC RNA level. *, significantly different from control (DMSO) at $p < 0.05$ (Student's *t* test).

Down-regulation of serpinE2 expression in human colorectal cancer cells inhibits soft agarose colony formation, migration and tumor growth in nude mice.

We next investigated the effect of serpinE2 knockdown on anchorage independent growth and cell migration after downregulation of *serpinE2* gene expression by RNA interference in HCT116 and LoVo cells. As shown in Fig. 4A, *serpinE2* mRNA were significantly reduced by respectively 37% and 88% in LoVo cells expressing

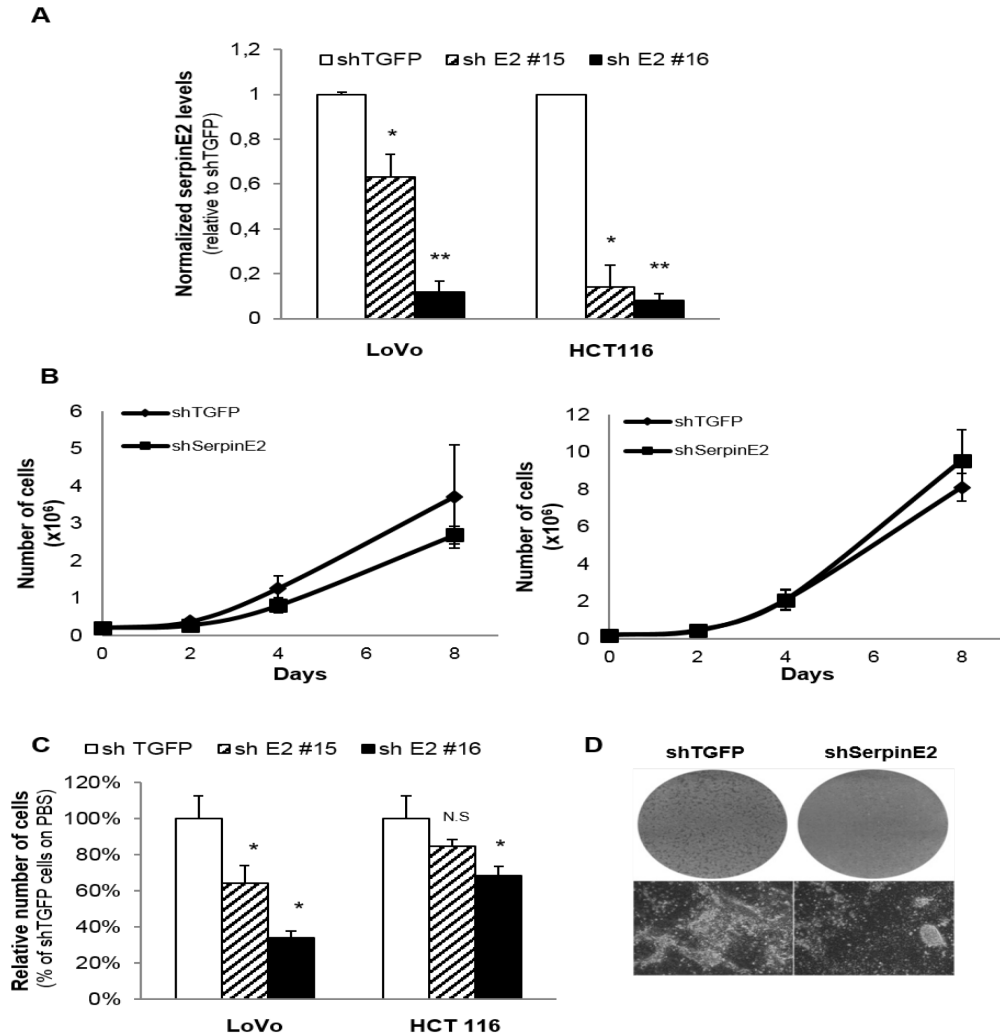


Figure 4. Down-regulation of serpinE2 expression in human colorectal cancer cells inhibits colony formation. **A-** HCT116 and LoVo cells were stably infected with lentiviruses encoding for a control shRNA (against TGFP) or encoding serpinE2-specific shRNAs (shSerpinE2#15 or shSerpinE2#16). Stable cell populations were thereafter lysed and RNA isolated to determine *serpinE2* or $\beta 2MIC$ gene expression by Q-PCR. The relative level of each mRNA was calculated using the standard curve method and normalized to the corresponding $\beta 2MIC$ mRNA level. **B-** LoVo or HCT116 cells expressing either shTGFP or shSerpinE2 (#16) were seeded in a 6-well plate at 200 000 cells per well. Cells were harvested, clumps disrupted using a syringe and counted. Values are means of 4 experiments \pm SE. **C-** Cell populations were cultured in soft agarose for 2-3 weeks before MTT staining. The number of colonies was determined using Image J software. The number of shTGFP-expressing cells (control) was set at 100%. Results are the mean \pm SE of at least 3 independent experiments. **D-** Phase-contrast microscopy of foci from two-week post-confluent shTGFP and shSerpinE2(#16)-expressing LoVo cells stained with crystal violet. *, significantly different from shTGFP cell populations (set at 1) at $p < 0.05$ (Student's *t* test); **, significantly different from control at $p < 0.002$ (Student *t* test). shSerpinE2 (#15) or shSerpinE2 (#16) and by 77% and 92% in HCT116 expressing

shSerpineE2 (#15) or shSerpineE2 (#16); conversely, expression of the control shRNA (shTGFP) had no effect on endogenous *serpineE2* expression (data not shown). Again, the proliferation rate of these cell populations was assessed when cultured on plastic. No difference was observed in the proliferation rate of subconfluent cells when *serpineE2* expression was downregulated (Fig.4B). We then verified whether the reduction in *serpineE2* expression alters the ability of colon cancer cells to form colonies in soft agarose. As shown in Fig. 4C, expression of both shRNA against SerpineE2 (#15 and #16) decreased the ability of HCT116 and LoVo cells to form colonies in soft agarose. Of note, shSerpineE2 (#15) which was less efficient than the shRNA (#16) to reduce *serpineE2* gene expression (Fig.4A) was also less efficient to reduce colony formation. This indicates that *serpineE2* controls anchorage-independent growth of human colon carcinoma cells. Additionally, as observed in caMEK-expressing IECs, the size of foci formed at post-confluency was significantly decreased in *serpineE2*-depleted LoVo cells (Fig.4D). The tumorigenicity of colorectal cell lines was next assessed after subcutaneous (s.c.) injection into the flank of nude mice. As shown in Fig. 5A and B, HCT116 and LoVo cell lines induced palpable tumors with a short latency period of respectively 15 and 10 days after their injection. More importantly, downregulation of *serpineE2* expression with shSerpineE2 (#16) in these cell lines severely impaired their capacity to grow as tumors in nude mice.

Finally, *in vitro* transwell migration assays were performed to verify the importance of *serpineE2* in colon carcinoma cell migration. As illustrated in Fig.6A, *serpineE2* deficiency significantly reduced HCT116 (not shown) and LoVo cell migration to the undersurface of the membrane coated or not with fibronectin or vitronectin (data not shown). The net effect of *serpineE2* knockdown was also determined on invasion by using BD Biocoat Matrigel invasion chambers, in presence of hydroxyurea. As shown in Fig. 6B, the capacity of LoVo cells to invade Matrigel was also altered by *serpineE2* silencing.

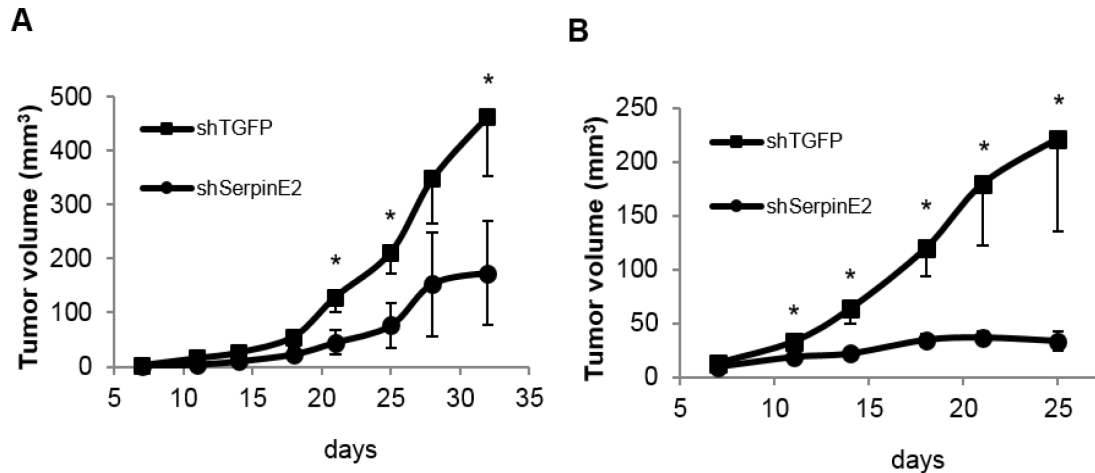


Figure 5. Down-regulation of serpinE2 expression in human colorectal cancer cells inhibits tumor growth in nude mice. A and B- The growth of tumors (mm³) over time was measured after s.c. injection of 1×10^6 cells (HCT116: left panel; LoVo: right panel). The results represent the mean tumor volume obtained from two independent experiments in which at least five mice were injected for each cell line. Tumor volumes were determined by external measurement ($V = (d^2 \times D)/2$). Data are the means \pm SE of five mice. *, significantly different from HCT116- or LoVo-shSerpinE2 (#16) cells at * $p < 0.05$.

To test the hypothesis that this altered migration and invasion capacity could result from a defect in cell adhesion, adhesion strength to the substrate was examined for control and shSerpinE2 (#16)-expressing LoVo cells. Using a trypsin-mediated de-adhesion assay, downregulation of serpinE2 significantly delayed LoVo cell detachment after trypsinization (Fig.6C), suggesting that serpinE2 expression decreases adhesion of colorectal carcinoma cells to the substrate.

SerpinE2 gene expression is up-regulated in human colorectal cancers.

We next analyzed *serpinE2* gene expression in a series of human paired specimens (resection margins and primary tumors) by Q-PCR analysis. As shown in Fig.7, mRNA levels of serpinE2 were markedly increased in human adenomas in comparison to healthy adjacent tissues. Furthermore, serpinE2 expression was also significantly enhanced in colorectal tumors, regardless of tumor stage and grade.

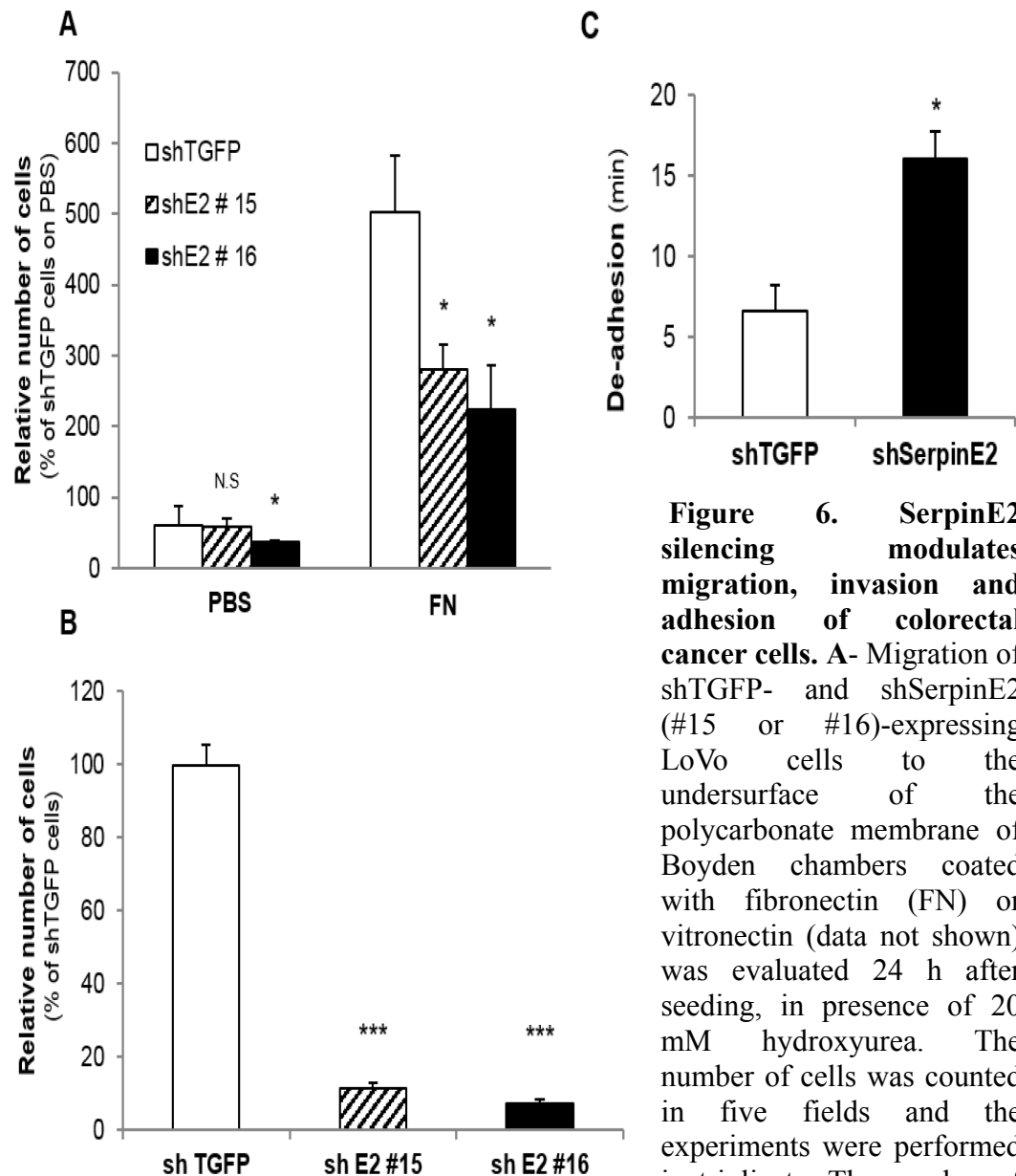


Figure 6. SerpinE2 silencing modulates migration, invasion and adhesion of colorectal cancer cells. **A-** Migration of shTGFP- and shSerpineE2 (#15 or #16)-expressing LoVo cells to the undersurface of the polycarbonate membrane of Boyden chambers coated with fibronectin (FN) or vitronectin (data not shown) was evaluated 24 h after seeding, in presence of 20 mM hydroxyurea. The number of cells was counted in five fields and the experiments were performed in triplicate. The number of shTGFP cells that had migrated was set at 100%. **B-** Invasion of shTGFP- and shSerpineE2 (#15 or #16)-expressing LoVo cells was studied using Matrigel-coated Transwells during 48 h. Thereafter, cells were fixed and stained with DAPI solution. The number of cells was counted in five fields and the experiments performed in duplicate. The number of shTGFP cells which had migrated was set at 100%. **C-** Time required for complete de-adhesion of shTGFP- and shSerpineE2 (#16)-expressing LoVo cells after addition of trypsin while rocking at 100rpm. *, significantly different from shTGFP at $p < 0.05$ (Student's t test). ***, significantly different from control at $p < 0.0001$ (Student t test).

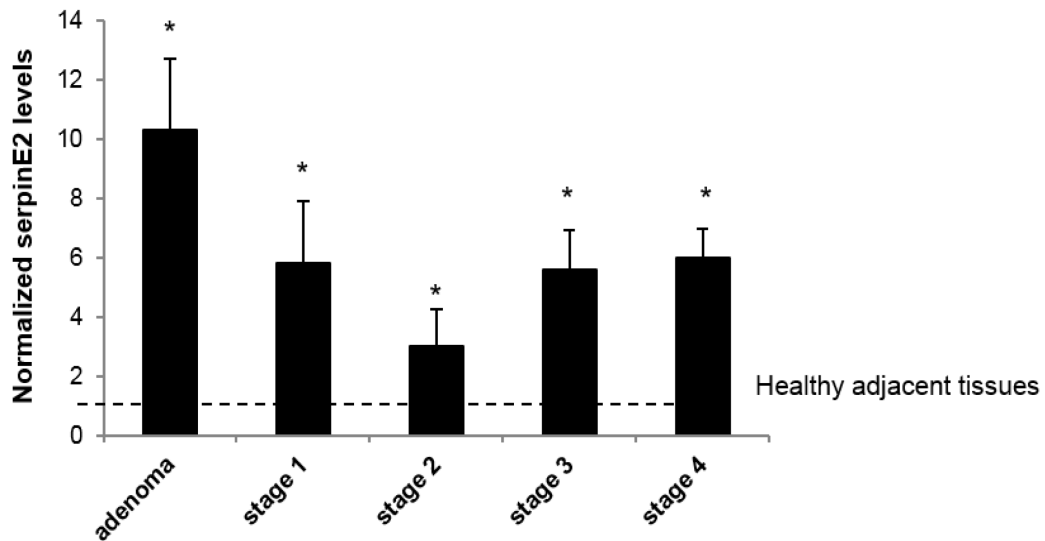


Figure 7. *SerpinE2* gene expression is up-regulated in human colorectal tumors. Relative *serpinE2* mRNA levels were determined by Q-PCR of human advanced adenomas and cancers compared to the adjacent healthy tissue (set at 1). mRNA levels were normalized to $\beta 2MIC$ mRNA levels. Data presented in are means \pm SE of 5 to 19 biopsies per stage. *, significantly different from adjacent healthy tissue at $p < 0.05$ (Student's *t* test).

To test the hypothesis that this altered migration and invasion capacity could result from a defect in cell adhesion, adhesion strength to the substrate was examined for control and shSerpinE2 (#16)-expressing LoVo cells. Using a trypsin-mediated de-adhesion assay, downregulation of serpinE2 significantly delayed LoVo cell detachment after trypsinization (Fig.6C), suggesting that serpinE2 expression decreases adhesion of colorectal carcinoma cells to the substrate.

Discussion

We and others have recently reported that expression of a constitutively active mutant of MEK1 in normal intestinal epithelial cells is sufficient to induce growth factor relaxation for DNA synthesis, morphological transformation, growth in soft agar, epithelial to mesenchymal transition and to promote tumor invasion and metastasis [3,4,14,15]. Thus, these data argue that a key role of sustained MEK activity resulting from the constitutive activation of KRAS or BRAF in colorectal carcinoma cells may be to provide signals inducing not only proliferation, but also transformation and tumorigenesis. However, in spite of the obvious role of MEK/ERK kinases in the

induction and regulation of intestinal epithelial cell tumorigenesis, little is known as to the molecular mechanisms by which this signaling achieves such functions. In the present study, we show that *serpinE2* gene is a MEK1 target in intestinal epithelial cells and that serpinE2 expression and secretion correlate with both MEK1 activity and intestinal epithelial cell transformation. Moreover, targeting of *serpinE2* by mRNAi in human colorectal cancer cell lines decreased anchorage independent growth, migration, invasion as well as tumor formation in nude mice. Accordingly, we found an upregulation of *serpinE2* mRNA levels in human adenomas and colorectal cancer tissues as compared to corresponding normal tissues.

Oncogenic mutations in *KRAS* or *BRAF* occur frequently in colorectal cancer and aberrant signaling through the ERK pathway has been correlated with both initiation [38] and progression [13] of CRC. Interestingly, *KRAS* and *BRAF* mutations seem to be mutually exclusive [39,40], suggesting that they may have similar functions. These oncogenes primarily signal through the MEK/ERK pathway [41,42]. Upon phosphorylation by MEK1/2, ERK1/2 translocate to the nucleus and phosphorylate various transcription factors regulating gene expression [43]. Therefore, in order to define the genetic changes induced by persistent MEK activation, we and others [4,15] have utilized oligonucleotide microarrays to determine which genes are regulated following the constitutive activation of MEK in normal intestinal epithelial cells. Our results revealed that *serpinE2* gene was the gene mostly induced by activated MEK in intestinal epithelial cells. This observed altered level of expression of *serpinE2* transcript was also noted in microarray analyses performed by Voisin and colleagues [15]. In the present study, we were able to confirm that *RAS*-, *BRAF*- and *caMEK*-transformed intestinal epithelial cells express and secrete serpinE2. Furthermore, serpinE2 expression was rapidly enhanced (in 1 h) upon induction of oncogenic BRAF in normal intestinal epithelial cells, suggesting an early involvement of this protein in cell transformation. Of note, expression of serpinE2 in human colorectal cancer cell lines was shown to be dependent, at least in part, of endogenous activities of MEK/ERK. Other oncogenic pathways have been previously associated with induction of serpinE2 expression. Indeed, the very oncogenic receptor

tyrosine kinase MET was also shown to promote *serpinE2* gene expression in a xenograft colon tumor model [44]. Additionally, PTEN deletion has been reported to up-regulate *serpinE2* expression in MEF cells [45] and serpinE2 was shown to be overexpressed in cells transformed by adenovirus type 12 [46]. Taken together, these results indicate that *serpinE2* gene expression could be induced by different oncogenic pathways, emphasizing that this protein may be important in tumorigenesis.

Our results also led to the demonstration that serpinE2 contributes to transformation induced by activated MEK1 and to human colorectal carcinoma cell growth and migration. In agreement with the present study, data on serpinE2 expression in human cancer indicate that serpinE2 levels are elevated in pancreatic tumors [27], breast tumors [28], liposarcomas [31] and oral squamous carcinomas [30]. Accordingly, we found a significantly higher level of *serpinE2* mRNA when comparing affected tissues from advanced adenomas and carcinomas to adjacent healthy tissues. These results are in agreement with the study of Selzer-Plon et al. who recently reported that *serpinE2* mRNA levels increase both at the transition between normal tissue and adenomas with mild/moderate dysplasia and again at the transition between severe dysplasia and colorectal cancer [32]. In addition, no significant difference was observed when comparing *serpinE2* mRNA levels in primary cancers classified into different TNM stages. Taken together, the above results suggest that enhanced serpinE2 expression may be implicated in tumor progression in colorectal tissue.

Although there is some evidence in the literature suggesting that serpinE2 may play a role in carcinogenesis, the precise function of this serpin in cancer still remains elusive. Through its ability to reduce proteolysis, this serine protease inhibitor is predicted to impair extracellular matrix degradation and consequently cancer cell invasion and metastasis. However, overexpression of serpinE2 appears to enhance the invasive potential of pancreatic tumors in xenograft models [27]. Recently, using mammary tumor models, it has been reported that serpinE2 stimulates metastatic spread of mammary tumors [47]. In addition, an analysis of 126 breast cancer patients

revealed that patients with breast tumors showing elevated serpinE2 levels also had a significantly higher probability of developing lung metastasis [47]. Finally, serpinE2 has recently been shown to promote lymph node metastasis in a testicular cancer model [48]. Thus, increased function of serpinE2 appears to be associated with enhanced migration and metastasis. However, the biological roles of serpinE2 in colorectal carcinoma have never been studied. Herein, the present results show that endogenous expression of serpinE2 in rodent transformed intestinal epithelial cells and human CRC cells is correlated with enhanced cell migration and invasion abilities. The molecular mechanism by which serpinE2 modulates motility remains unknown. It is possible that serpinE2 may enhance signaling cascades mediating motility. In this regard, serpinE2 has recently been reported to stimulate ERK signaling by binding LRP-1 [47] or syndecan-1 [49]. However, preliminary results (data not shown) indicate that the phosphorylated levels of Akt and ERK1/2 were not affected following serpinE2 depletion in colon carcinoma cells. Alternatively, shSerpinE2-expressing cells may have a reduced migratory capacity which could result from a defect in cell adhesion. Indeed, typical cell movement across a two-dimensional substrate can be divided into three concerted steps: membrane protrusion, cell traction, deadhesion and tail retraction. Adhesion at the leading edge and deadhesion at the rear portion of cells are required for protrusion and tail retraction, respectively [50]. As cellular migration and cellular adhesion are intimately related, changes in one could be expected to result in changes in the other. Binding of type-1 plasminogen activator inhibitor (PAI-1), the phylogenetically closest relative of serpinE2, to cell surface uPA promotes inactivation and internalization of adhesion receptors (e.g. urokinase receptor and integrins) and leads to cell detachment from a variety of extracellular matrixes [51]. Recently, serpinE2 has been shown to also induce cell detachment from a variety of extracellular matrix proteins such as vitronectin, fibronectin and type-1 collagen in an uPA/uPAR-dependent manner [52]. Interestingly, serpinE2 has been reported to co-localize with fibronectin [34] and to interact with vitronectin [35]. Accordingly, we observed herein that the downregulation of serpinE2 significantly delayed colorectal carcinoma cell detachment after trypsinization, suggesting that serpinE2 expression does decrease

adhesion and promote detachment of colorectal carcinoma cells. Moreover, we have recently demonstrated that uPA expression levels are enhanced in MEK1-transformed intestinal epithelial cells [14]. Further experiments are hence necessary to clearly identify the molecular mechanisms involved in the deadhesive effects of serpinE2.

Conclusion

Our study identifies the serine protease inhibitor serpinE2 as a novel target of ERK signaling involved in human colorectal tumorigenesis. The strong expression of serpinE2 in human adenomas suggests that this secreted protein might be a potential blood biomarker for early diagnosis of tumors in the colon and the rectum. While further studies are needed to pinpoint the molecular mechanisms by which serpinE2 regulates tumor cell growth and migration, the present study provides novel fundamental insights into the function of serpinE2 in colorectal cancer progression. Hence, serpinE2 may also be a potential therapeutic target for cancer treatment.

Methods

Materials

The anti-bovine serpinE2 antibody was previously characterized [53]. The antibody recognizing β -actin was obtained from Chemicon International (Billerica, MA). Antibodies recognizing phospho-ERK1/2 (Thr202/Tyr204) #9101 and total ERK were from Cell Signaling Technology (Danvers, MA). The MEK inhibitor U0126 was from Calbiochem-Novabiochem Corp. (San Diego, CA). Human plasma-derived fibronectin and vitronectin were from R&D systems (Minneapolis, MN). MTT was purchased from Invitrogen (Carlsbad, CA). Other materials were obtained from Sigma-Aldrich unless stated otherwise.

Cell culture

The rat intestinal epithelial crypt cell line IEC-6 stably overexpressing pLXIN-wtMEK or -caMEK were previously characterized [3] and cultured as described [14]. These cell populations were generated after viral infection of wtMEK and caMEK cloned in the retroviral vector pLXIN. The caMEK-expressing cells formed foci at post-confluency, in contrast to pLXIN- and wtMEK-expressing epithelioid cells which formed a monolayer of contact-inhibited cells. Foci from post-confluent caMEK-expressing cells were therefore retrieved by aspiration with a pipette and pooled as one caMEK-expressing cell population. The majority of experiments described herein was performed with this caMEK-expressing cell population and compared to pLXIN and wtMEK-expressing cell populations unless otherwise stated. This strategy was repeated independently three times with other IEC-6 cell cultures and similar results were obtained with all caMEK-expressing cell populations. The IEC6 wtMEK and caMEK were cultured in DMEM containing 5% FCS. The IEC-6-BRAF:ER population was obtained by retroviral infection of IEC-6 cells as previously described [14] with the plasmid encoding the fusion protein consisting of full-length human BRAF^{V600E} linked to the T1 form of the human estrogen receptor hormone-binding domain and selection of cells resistant to blasticidin S (5 mg/ml). The population displayed strong stimulation of ERK1/2 activity upon β -estradiol or tamoxifen addition as previously reported [54]. IEC6 BRAF^{V600E} cells were cultured

in DMEM without phenol red, supplemented with 5% charcoal stripped FCS (Valley Biomedical, Winchester, VA, USA). The transformed cell line *Ha-ras*IEC-6, previously characterized [55], was cultured in DMEM containing 5% FCS. The cell line Caco-2/15 was obtained from Dr A. Quaroni (Cornell University, Ithaca, NY) and cultured in DMEM containing 10% FCS, as described previously [56]. The colon carcinoma cell lines HCT116 and HT29 were obtained from ATCC (CCL-247 and HTB-38) and cultured in McCoy's medium (Wisent) containing 10% FCS. The colon adenocarcinoma cell lines Lovo (CCL 229, ATCC) and SW480 (CCL 228, ATCC) were respectively cultured in Ham's F12 medium containing 10% FCS and in DMEM containing 10% FBS. The colon adenocarcinoma cell lines DLD-1 (CCL-21) (kindly obtained from Dr F. Boudreau, Université de Sherbrooke, QC, Canada) and Colo205 (CCL-222, ATCC) were cultured in RPMI medium containing 10% FCS. The colorectal carcinoma cell line T84 (CCL-248) was cultured in DMEM-Ham's F-12 (50:50) containing 10% FBS.

Microarray analysis

Total RNAs were extracted from newly confluent IEC-6 cells stably expressing wtMEK or caMEK with the RNeasy kit (Qiagen inc., Mississauga, ON, Canada). For microarray analysis, 10 µg of RNA were used for cDNA synthesis, followed by *in vitro* transcription to generate biotin-labeled cDNAs with a T7 promoter primer having a poly(T) tail for subsequent hybridization. The resulting product was hybridized and processed with the Rat Genome RAE230 2.0 Array GeneChip system (Affymetrix). Three independent experiments were carried out for each condition. Data analysis, normalization, average difference and expression for each feature on the chip were performed using Affymetrix Microarray Suite 5.0 (MAS5) with default parameters (Microarray platform, McGill University and Genome Quebec Innovation Centre). Gene classification according to cellular processes was performed with the Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) [<http://apps1.niaid.nih.gov/david>].

Animals

CD1 nu/nu mice were purchased from Charles River Laboratory (Montréal, Canada). All experiments were approved by the animal research committee of the Faculty of Medicine and Health Sciences of the Université de Sherbrooke.

Human biopsies

Samples of colon tumors and paired normal colon tissues (at least 10 cm from the tumor) were obtained from patients undergoing surgical resection. Patients did not receive neoadjuvant therapy. Tissues were obtained after patient's written informed consent, according to the protocol approved by the Institutional Human Subject Review Board of the Centre Hospitalier Universitaire de Sherbrooke. Paired tissues were frozen in liquid nitrogen within 15 minutes from resection as recommended by the Canadian Tumor Repository Network [<http://www.ctrnet.ca>] and stored in liquid nitrogen until total RNA extraction. Clinical and pathological informations were obtained from medical records. Adenoma samples were endoscopically unresectable and defined as advanced because of their size larger than 1cm or by the presence of high-grade dysplasia or villous component. Patient's cancers were histologically classified and graded according to overall TNM staging criteria (based on Tumor-, lymph Node- and Metastatic- status).

Reverse transcription PCR

Total RNA was extracted from cultured cell lines or human colorectal adenoma or tumors and their respective adjacent healthy mucosa using the RNeasy mini kit (Qiagen, Canada) using gDNA Eliminator spin columns or an on-column DNase I digestion step (human samples). Reverse transcription and PCR were performed using AMV-RT (Roche Diagnostics, Canada) and Taq DNA polymerase (Qiagen, Canada) according to the manufacturer's instructions. Real-time PCR analysis (QPCR) was performed using a Light-Cycler apparatus (Roche Diagnostic, Canada) as previously described [14]. Target expression was quantified relatively to β -actin or TBP (rat) or β -2-microglobulin (β 2MIC) (human) [57] expression. Primers rSerpine2 forward: CCCTACCATGGTGTGAGAGCAT; rSerpine2 backward:

GCCTTTGACGGTTCAAACAT; Primers: mSerpine2 forward: CCCTACCATGGTGAGAGCAT; mSerpine2 backward: GCCTTTGATGGCTCAAACAT; hSerpine2 forward: AATGAAACCAGGGATATGATTGAC; hSerpine2 backward: TTGCAAGATATGAGAAACATGGAG; β -actin forward: ACCACAGCTGACAGGAAATCG; β -actin backward: AGAGGTCTTTACGCATGTCAACG; TBP forward: TTCAGTTCTGGGAAAATGGTG; TBP backward: GGAGAACAATTCTGGGTTTGA; β 2MIC forward: ATGGCCTCCGTGTTCCTAC; β 2MIC backward: TCGCGCTAC TCTCTGTTTCTG.

Immunoblotting

SDS-PAGE and immunoblot analyses were performed as previously described [3]. For culture medium analysis, subconfluent cells cultured in a 100 mm dish were incubated overnight with a fresh 8 mL of serum free medium after which the medium collected and cells harvested in a lysis buffer containing 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 40 mM Tris-HCl, pH 7.6, 1% NP-40 supplemented with protease inhibitors (0.1 mM PMSF, 10 μ g/ml leupeptin, 1 μ g/ml pepstatin, 10 μ g/ml aprotinin). A volume of medium proportional to the total amount of protein in the cell lysate was passed through an Amicon® Ultra-4 centrifugal filter unit (10,000 NMWL; Millipore). Laemmli buffer was added to the retentate and boiled for 5 min. Protein concentrations were determined using the bicinchoninic acid (BCA) assay (Pierce) with bovine serum albumin as standard.

RNA interference

Rat IEC6 cells: shRNA oligonucleotides were designed according to Ambion guidelines (technical bulletin no. 506), annealed and cloned into pLenti6-U6 expression vector [14] between BamHI and XhoI sites. siRNA sequences were AGGAACCATGAATTGGCAT (Serpine2) or GGCAGTTCAGACAGATTAA (Scrambled) and TTCAAGAGA as loop sequence. *Human LoVo and HCT116 cells:* To downregulate *serpine2* expression, mission® shRNA Bacterial Glycerol Stock were purchased from Sigma-Aldrich (NM_006216). Sequences used were CCGGCCTCGTCAACGCAGTGTATTTCTCGAGAAATACACTGCGTTGACGAG

GTTTTTG (shSerpineE2#15), CCGGGAACACAAAGAAACGCACTTTCTCGAG AAAGTG CGTTTCTTTGTGTTCTTTTTG (shSerpineE2#16) and CCGGCGTGATCTTCACCGACAAGATCTCGAGATCTTGTCGGTGAAGATCAC GTTTTT (control : TurboGFP™ (shTGFP)). All lentiviruses were produced and used for cell infection according to Invitrogen recommendations (ViraPower Lentiviral Expression System, instructions manual). In each experiment involving lentiviruses, *OAS1* gene expression was analyzed by Q-PCR analysis. *OAS1* (2'5'-oligoadenylate synthetase) is a classic interferon target gene and has been recommended as a key test for interferon induction before attributing a particular response to the gene that is targeted [58]. No induction of *OAS1* expression was detected in the experiments involving lentiviruses infection (data not shown).

Cell proliferation assays

All experiments were performed starting with cell populations after at least 14 days post-selection and subsequently plated for growth assay in 6-well plates at a concentration of 100 000 cells/well for IEC-6 and 200 000 cells/well for HCT116 and LoVo. Cell growth was measured during 7-8 days using a Cell particle counter.

Focus formation assays

Parental IEC-6 cells were seeded into 30-mm dishes in triplicate. Cells were grown to confluence and confluent monolayers were adapted over a week-long period to DMEM/5%FBS before seeding of caMEK-expressing cells at high density (5×10^3 cells/well). These cells were then grown by forming foci and maintained in culture for 14-20 days. Thereafter, cells were washed twice with 1X PBS and fixed with methanol for 1 min. Methanol was removed and 1% crystal violet solution was added for 2 min. Excess dye was carefully removed with water and plates were dried at room temperature. Analysis was performed by counting the number and size of the foci using Image J software. Resulting data were analyzed by Student's *t* test.

Soft agarose

Concentrated DMEM-2X without phenol red was prepared from powder (Wisent, Qc

Canada) according to manufacturer's instructions, except for using half of the recommended volume of water. The medium was sterilized by 0.22µm filtration and complemented with 10% (IEC6) or 20% (LoVo and HCT116) FBS. Pre-warmed DMEM-2X was mixed 1:1 with autoclaved 1.4% agarose type VII kept at 42°C and 6-well dishes were pre-coated with 1 ml/well. Cells were added to the DMEM-agarose mix at 10 000 cells/mL (IEC6) or 5 000 cells/mL (LoVo and HCT116) and seeded at 2 mL/well. Plates were allowed to solidify under the hood and then placed at 37°C and 5% CO₂. Fresh DMEM without phenol red supplemented with 5% (IEC6) - 10% (LoVo and HCT116) FBS was added on the surface of the agarose every 2-3 days. After 2-3 weeks, colonies were stained by adding 500 µL of PBS containing 0.5 mg/mL MTT on the surface of the agarose and incubated 2 hours at 37°C and 5% CO₂. Images were acquired using an AlphaImager camera (Alpha Innotech Corporation) and colonies counted using ImageJ software.

Migration and invasion assays

Cell migration was assessed using Transwell®-24 well permeable support (8.0-µm pored polycarbonate membranes (Corning)). The bottom face of membranes was coated or not with 10 µg/µL fibronectin or vitronectin for 1 hour at 37°C and then rinsed with PBS. Thereafter, 3x10⁴ cells in 200µL of serum-free medium were seeded into the upper chamber and culture medium containing 5% FBS was placed into the lower chamber as chemoattractant agent. Cells were allowed to migrate for the next 24h (IEC-6) or 48h (LoVo) in the presence of 2 mM hydroxyurea in both chambers to prevent cell proliferation. Non-migrating cells were removed with 2 cotton swabs, while migrating cells were fixed for 2 min with methanol and stained with DAPI for manual counting under the microscope. Invasion assays were conducted using BD Matrigel™ Invasion Chamber 24-well plate 8.0 micron according to the manufacturer's instructions. Briefly, plates were thawed at room temperature for 30 min and then Matrigel humidified with HAM'S F12 culture medium for at least 1 hour at 37°C and 5% CO₂. Thereafter, 6x10⁴ cells in 200µL of serum-free medium were seeded into the upper chamber and culture medium containing 5% FBS was placed into the lower chamber as chemoattractant agent. Cells were allowed to

migrate for the next 48h in the presence of 2 mM hydroxyurea in both chambers to prevent cell proliferation [59]. Cells were then processed as described above for migration assays.

Xenografts into nude mice

A total of 1×10^6 cells suspended in 0.1 ml DMEM were injected into the dorsal subcutaneous (s.c.) tissue of 5-week-old female nude mice CD1 *nu/nu* (Charles River, Canada). Both control and experimental cell lines were *contralaterally* injected into each individual animal. Tumor volume was determined by external measurement according to published methods $(d^2 \times D)/2$ [60].

De-adhesion assays

Subconfluent cells were rinsed twice with PBS before addition of 500 μ L of 0.25% trypsin/0.1 mM EDTA (Wisent, Qc, Canada) per well of a 6-well dish. Plates were rocked at 100 RPM at room temperature until cells were completely detached.

Data Presentation and Statistical Analysis

Densitometric analyses were performed using Image J software and were carried out in RT-PCR analyses shown in Fig.1. Results shown in the graphs were analyzed by the Student's *t* test. Differences were considered significantly different at $p < 0.05$, unless otherwise stated. Results shown are the mean of at least three independent experiments.

Competing Interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

MJB performed the microarray analysis. SB performed the molecular genetic studies, generated shRNA against serpinE2. SB and EL characterized the phenotype of all shSerpinE2-expressing cell populations (Fig.2, 4 and 6). SB also analyzed *serpinE2* mRNA levels in human colorectal tumors and cell lines (Fig.3A and 6). Finally, SB

drafted the manuscript. VD performed the first RT-PCR and Western blot analyses demonstrating the induction of serpinE2 by oncogenic MEK1 and Ras (Fig.1A,B,D and E). SC generated cells expressing the inducible BRAF:ER fusion protein stimulated with 4-hydroxytamoxifen (4-OHT) (Fig.1C). EL participated in the design of the study and performed Q-PCR analyses (Fig.3B and 4A). NR conceived the study, and participated in its design and coordination and helped draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

We thank Anne Vézina and Gérald Bernatchez for technical assistance. The biobank of colorectal cancer specimens was supported by a Team grant on digestive epithelium from the Canadian Institutes of Health Research. This research was supported by a grant from the Canadian Institutes of Health Research Grant to Nathalie Rivard (MT-14405). Sébastien Bergeron is a recipient of a post-doctoral fellowship from the Canadian Association of Gastroenterology/CIHR/CCFC. Étienne Lemieux is student scholar from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ). Nathalie Rivard, Marie-Josée Boucher and Julie C Carrier are members of the FRSQ-Funded Centre de Recherche Clinique Étienne Le-Bel. Marie-Josée Boucher and Julie C Carrier are recipient of a scholar from FRSQ. Nathalie Rivard is a recipient of a Canadian Research Chair in Signaling and Digestive Physiopathology.

Reference List

1. Nishimura T: Total number of genome alterations in sporadic gastrointestinal cancer inferred from pooled analyses in the literature. *Tumour Biol* 2008, 29: 343-350.
2. Reddy KB, Nabha SM, Atanaskova N: Role of MAP kinase in tumor progression and invasion. *Cancer Metastasis Rev* 2003, 22: 395-403.
3. Boucher MJ, Jean D, Vezina A, Rivard N: Dual role of MEK/ERK signaling in senescence and transformation of intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004, 286: G736-G746.
4. Komatsu K, Buchanan FG, Katkuri S, Morrow JD, Inoue H, Otake M *et al.*: Oncogenic potential of MEK1 in rat intestinal epithelial cells is mediated via cyclooxygenase-2. *Gastroenterology* 2005, 129: 577-590.
5. Eggstein S, Franke M, Kutschka I, Manthey G, von Specht BU, Ruf G *et al.*: Expression and activity of mitogen activated protein kinases in human colorectal carcinoma. *Gut* 1999, 44: 834-838.
6. Lee SH, Lee JW, Soung YH, Kim SY, Nam SW, Park WS *et al.*: Colorectal tumors frequently express phosphorylated mitogen-activated protein kinase. *APMIS* 2004, 112: 233-238.
7. Hoshino R, Chatani Y, Yamori T, Tsuruo T, Oka H, Yoshida O *et al.*: Constitutive activation of the 41-/43-kDa mitogen-activated protein kinase signaling pathway in human tumors. *Oncogene* 1999, 18: 813-822.
8. Kuno Y, Kondo K, Iwata H, Senga T, Akiyama S, Ito K *et al.*: Tumor-specific activation of mitogen-activated protein kinase in human colorectal and gastric carcinoma tissues. *Jpn J Cancer Res* 1998, 89: 903-909.
9. Licato LL, Brenner DA: Analysis of signaling protein kinases in human colon or colorectal carcinomas. *Dig Dis Sci* 1998, 43: 1454-1464.
10. Roberts PJ, Der CJ: Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene* 2007, 26: 3291-3310.
11. Adjei AA, Cohen RB, Franklin W, Morris C, Wilson D, Molina JR *et al.*: Phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of the oral, small-molecule mitogen-activated protein kinase kinase 1/2 inhibitor AZD6244 (ARRY-142886) in patients with advanced cancers. *J Clin Oncol* 2008, 26: 2139-2146.
12. Wang JY, Wilcoxon KM, Nomoto K, Wu S: Recent advances of MEK inhibitors and their clinical progress. *Curr Top Med Chem* 2007, 7: 1364-1378.
13. Licato LL, Keku TO, Wurzelmann JI, Murray SC, Woosley JT, Sandler RS *et al.*: In vivo activation of mitogen-activated protein kinases in rat intestinal neoplasia. *Gastroenterology* 1997, 113: 1589-1598.
14. Lemieux E, Bergeron S, Durand V, Asselin C, Saucier C, Rivard N: Constitutively active MEK1 is sufficient to induce epithelial-to-mesenchymal transition in intestinal epithelial cells and to promote tumor invasion and metastasis. *Int J Cancer* 2009, 125: 1575-1586.

15. Voisin L, Julien C, Duhamel S, Gopalbhai K, Claveau I, Saba-El-Leil MK *et al.*: Activation of MEK1 or MEK2 isoform is sufficient to fully transform intestinal epithelial cells and induce the formation of metastatic tumors. *BMC Cancer* 2008, 8: 337.
16. Fang JY, Richardson BC: The MAPK signalling pathways and colorectal cancer. *Lancet Oncol* 2005, 6: 322-327.
17. Silverman GA, Bird PI, Carrell RW, Church FC, Coughlin PB, Gettins PG *et al.*: The serpins are an expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins. Evolution, mechanism of inhibition, novel functions, and a revised nomenclature. *J Biol Chem* 2001, 276: 33293-33296.
18. Vassalli JD, Huarte J, Bosco D, Sappino AP, Sappino N, Velardi A *et al.*: Protease-nexin I as an androgen-dependent secretory product of the murine seminal vesicle. *EMBO J* 1993, 12: 1871-1878.
19. Chen LM, Zhang X, Chai KX: Regulation of prostatic expression and function in the prostate. *Prostate* 2004, 59: 1-12.
20. Myerburg MM, McKenna EE, Luke CJ, Frizzell RA, Kleyman TR, Pilewski JM: Prostatic expression is regulated by airway surface liquid volume and is increased in cystic fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2008, 294: L932-L941.
21. Gurwitz D, Simon MM, Fruth U, Cunningham DD: Protease nexin-1 complexes and inhibits T cell serine proteinase-1. *Biochem Biophys Res Commun* 1989, 161: 300-304.
22. Baker JB, Low DA, Simmer RL, Cunningham DD: Protease-nexin: a cellular component that links thrombin and plasminogen activator and mediates their binding to cells. *Cell* 1980, 21: 37-45.
23. Scott RW, Bergman BL, Bajpai A, Hersh RT, Rodriguez H, Jones BN *et al.*: Protease nexin. Properties and a modified purification procedure. *J Biol Chem* 1985, 260: 7029-7034.
24. Bajou K, Noel A, Gerard RD, Masson V, Brunner N, Holst-Hansen C *et al.*: Absence of host plasminogen activator inhibitor 1 prevents cancer invasion and vascularization. *Nat Med* 1998, 4: 923-928.
25. Liu G, Shuman MA, Cohen RL: Co-expression of urokinase, urokinase receptor and PAI-1 is necessary for optimum invasiveness of cultured lung cancer cells. *Int J Cancer* 1995, 60: 501-506.
26. Bajou K, Peng H, Laug WE, Maillard C, Noel A, Foidart JM *et al.*: Plasminogen activator inhibitor-1 protects endothelial cells from FasL-mediated apoptosis. *Cancer Cell* 2008, 14: 324-334.
27. Buchholz M, Biebl A, Neesse A, Wagner M, Iwamura T, Leder G *et al.*: SERPINE2 (protease nexin I) promotes extracellular matrix production and local invasion of pancreatic tumors in vivo. *Cancer Res* 2003, 63: 4945-4951.
28. Candia BJ, Hines WC, Heaphy CM, Griffith JK, Orlando RA: Protease nexin-1

- expression is altered in human breast cancer. *Cancer Cell Int* 2006, 6: 16.
29. Yang S, Dong Q, Yao M, Shi M, Ye J, Zhao L *et al.*: Establishment of an experimental human lung adenocarcinoma cell line SPC-A-1BM with high bone metastases potency by (99m)Tc-MDP bone scintigraphy. *Nucl Med Biol* 2009, 36: 313-321.
 30. Gao S, Krogdahl A, Sorensen JA, Kousted TM, Dabelsteen E, Andreasen PA: Overexpression of protease nexin-1 mRNA and protein in oral squamous cell carcinomas. *Oral Oncol* 2008, 44: 309-313.
 31. Thelin-Jarnum S, Lassen C, Panagopoulos I, Mandahl N, Aman P: Identification of genes differentially expressed in TLS-CHOP carrying myxoid liposarcomas. *Int J Cancer* 1999, 83: 30-33.
 32. Selzer-Plon J, Bornholdt J, Friis S, Bisgaard HC, Lothe IM, Tveit KM *et al.*: Expression of prostaticin and its inhibitors during colorectal cancer carcinogenesis. *BMC Cancer* 2009, 9: 201.
 33. Low DA, Baker JB, Koonce WC, Cunningham DD: Released protease-nexin regulates cellular binding, internalization, and degradation of serine proteases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981, 78: 2340-2344.
 34. Farrell DH, Wagner SL, Yuan RH, Cunningham DD: Localization of protease nexin-1 on the fibroblast extracellular matrix. *J Cell Physiol* 1988, 134: 179-188.
 35. Rovelli G, Stone SR, Preissner KT, Monard D: Specific interaction of vitronectin with the cell-secreted protease inhibitor glia-derived nexin and its thrombin complex. *Eur J Biochem* 1990, 192: 797-803.
 36. Wang Z, Li Y, Liu ET, Yu Q: Susceptibility to cell death induced by blockade of MAPK pathway in human colorectal cancer cells carrying Ras mutations is dependent on p53 status. *Biochem Biophys Res Commun* 2004, 322: 609-613.
 37. Trainer DL, Kline T, McCabe FL, Faucette LF, Feild J, Chaikin M *et al.*: Biological characterization and oncogene expression in human colorectal carcinoma cell lines. *Int J Cancer* 1988, 41: 287-296.
 38. Calcagno SR, Li S, Colon M, Kreinest PA, Thompson EA, Fields AP *et al.*: Oncogenic K-ras promotes early carcinogenesis in the mouse proximal colon. *Int J Cancer* 2008, 122: 2462-2470.
 39. Yuen ST, Davies H, Chan TL, Ho JW, Bignell GR, Cox C *et al.*: Similarity of the phenotypic patterns associated with BRAF and KRAS mutations in colorectal neoplasia. *Cancer Res* 2002, 62: 6451-6455.
 40. Li WQ, Kawakami K, Ruzkiewicz A, Bennett G, Moore J, Iacopetta B: BRAF mutations are associated with distinctive clinical, pathological and molecular features of colorectal cancer independently of microsatellite instability status. *Mol Cancer* 2006, 5: 2.
 41. Niault T, Baccarini M: Targets of Raf in tumorigenesis. *Carcinogenesis* 2010.
 42. Wong KK: Recent developments in anti-cancer agents targeting the Ras/Raf/

- MEK/ERK pathway. *Recent Pat Anticancer Drug Discov* 2009, 4: 28-35.
43. Treisman R: Regulation of transcription by MAP kinase cascades. *Curr Opin Cell Biol* 1996, 8: 205-215.
 44. van der Horst EH, Chinn L, Wang M, Velilla T, Tran H, Madrona Y *et al.*: Discovery of fully human anti-MET monoclonal antibodies with antitumor activity against colon cancer tumor models in vivo. *Neoplasia* 2009, 11: 355-364.
 45. Li G, Hu Y, Huo Y, Liu M, Freeman D, Gao J *et al.*: PTEN deletion leads to up-regulation of a secreted growth factor pleiotrophin. *J Biol Chem* 2006, 281: 10663-10668.
 46. Guan H, Smirnov DA, Ricciardi RP: Identification of genes associated with adenovirus 12 tumorigenesis by microarray. *Virology* 2003, 309: 114-124.
 47. Fayard B, Bianchi F, Dey J, Moreno E, Djaffer S, Hynes NE *et al.*: The serine protease inhibitor nexin-1 controls mammary cancer metastasis through LRP-1-mediated MMP-9 expression. *Cancer Res* 2009, 69: 5690-5698.
 48. Nagahara A, Nakayama M, Oka D, Tsuchiya M, Kawashima A, Mukai M *et al.*: SERPINE2 is a possible candidate promotor for lymph node metastasis in testicular cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2010, 391: 1641-1646.
 49. Li X, Herz J, Monard D: Activation of ERK signaling upon alternative protease nexin-1 internalization mediated by syndecan-1. *J Cell Biochem* 2006, 99: 936-951.
 50. Le Clainche C, Carlier MF: Regulation of actin assembly associated with protrusion and adhesion in cell migration. *Physiol Rev* 2008, 88: 489-513.
 51. Czekay RP, Loskutoff DJ: Unexpected role of plasminogen activator inhibitor 1 in cell adhesion and detachment. *Exp Biol Med (Maywood)* 2004, 229: 1090-1096.
 52. Czekay RP, Loskutoff DJ: Plasminogen activator inhibitors regulate cell adhesion through a uPAR-dependent mechanism. *J Cell Physiol* 2009, 220: 655-663.
 53. Bedard J, Brule S, Price CA, Silversides DW, Lussier JG: Serine protease inhibitor-E2 (SERPINE2) is differentially expressed in granulosa cells of dominant follicle in cattle. *Mol Reprod Dev* 2003, 64: 152-165.
 54. Liu J, Suresh Kumar KG, Yu D, Molton SA, McMahan M, Herlyn M, Thomas-Tikhonenko A, and Fuchs SY. Oncogenic BRAF regulates beta-Trcp expression and NF-kappaB activity in human melanoma cells. *Oncogene* 2007, 26: 1954-1958.
 55. Boudreau F, Zannoni S, Pelletier N, Bardati T, Yu SJ, Asselin C: Negative regulation of glucocorticoid-dependent induction of c-fos by ras in intestinal epithelial cells. *Mol Cell Biochem* 1999, 195: 99-111.
 56. Deschenes C, Vezina A, Beaulieu JF, Rivard N: Role of p27(Kip1) in human intestinal cell differentiation. *Gastroenterology* 2001, 120: 423-438.

57. Dydensborg AB, Herring E, Auclair J, Tremblay E, Beaulieu JF: Normalizing genes for quantitative RT-PCR in differentiating human intestinal epithelial cells and adenocarcinomas of the colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006, 290: G1067-G1074.
58. Bridge AJ, Pebernard S, Ducraux A, Nicoulaz AL, Iggo R: Induction of an interferon response by RNAi vectors in mammalian cells. *Nat Genet* 2003, 34: 263-264.
59. Calzado MA, Macho A, Lucena C, Munoz E: Hydroxyurea inhibits the transactivation of the HIV-long-terminal repeat (LTR) promoter. *Clin Exp Immunol* 2000, 120: 317-323.
60. Wang J, Sun L, Myeroff L, Wang X, Gentry LE, Yang J *et al.*: Demonstration that mutation of the type II transforming growth factor beta receptor inactivates its tumor suppressor activity in replication error-positive colon carcinoma cells. *J Biol Chem* 1995, 270: 22044-22049.

Manuscrit 4. Oncogenic KRAS signalling promotes Wnt/ β -catenin pathway through LRP6 in colorectal cancer.

Etienne Lemieux¹, Julie Carrier² and Nathalie Rivard^{1§}

¹ Department of Anatomy and Cellular Biology, Cancer Research Pavilion, Faculty of Medicine and Health Sciences, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada. ² Service of Gastroenterology, Department of Medicine, Faculty of Medicine and Health Sciences, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada.

Statut de l'article : Soumis à la revue Oncogene en date du 22 avril 2014. Numéro de soumission : ONC-2014-00853.

Avant-propos

La dérégulation de la voie Wnt/ β -caténine, associée à la perte de fonction d'APC, est un événement majeur et très fréquent menant à l'initiation tumorale dans le colon. L'accumulation nucléaire de la β -caténine et l'augmentation de ses gènes cibles sont grandement impliqués dans la prolifération cellulaire et la tumorigénèse. Même si la voie KRAS/MAP Kinase et la voie Wnt/ β -caténine sont les deux principales voies de signalisation pouvant mener à la tumorigénèse colorectale, peu d'études se sont intéressées à leur potentielle interaction durant le processus de carcinogénèse. Nous avons émis l'hypothèse que ces deux voies s'interconnectaient lors de la tumorigénèse des cellules épithéliales intestinales. Ainsi, nous avons analysé la contribution du sentier Wnt/ β -caténine dans la transformation des cellules épithéliales induite par l'activation oncogénique de KRAS, de BRAF et de MEK1 et corrélé ces observations dans les cellules CRC et tumeurs humaines.

Contribution

J'ai effectué la totalité des expériences sur les modèles cellulaires, incluant les immunobuvardages, les immunofluorescences, les Co-IP, les essais luciférase, les essais de migration et d'invasion, les essais chez la souris immunodéficiente ainsi que les RT et qPCR. J'ai cloné la construction codant pour Δ NTCF4 pour permettre la production de

virus. J'ai également dirigé le projet de recherche, rédigé la première version du document et préparé les figures. Julie Carrier a fourni les tissus cancéreux humains. Nathalie Rivard a participé et coordonné la conception de l'étude de même que la rédaction du manuscrit.

Résumé

Nous avons montré l'activation du sentier Wnt/ β -caténine par l'activation oncogénique de la voie KRAS/MAP Kinase ainsi que son implication dans la transformation des cellules épithéliales intestinales IEC-6. Nous avons en effet montré que l'expression du mutant hyperactif de MEK1 augmente l'activité transcriptionnelle du complexe β -caténine/TCF4 en induisant la phosphorylation du co-récepteur des Wnts LRP6 sur résidus 1490 et 1572. Par conséquent, une augmentation de la localisation nucléaire de la β -caténine ainsi que de l'expression de ses gènes cibles impliquées dans la carcinogénèse colorectale, notamment c-myc, est observée dans les cellules transformées par l'hyperactivation de MEK1. Aussi, nos résultats suggèrent un nouveau mécanisme de régulation de l'activité transcriptionnelle du complexe β -caténine/TCF4 non associé à une inhibition de la dégradation de la β -caténine.

De manière intéressante, l'utilisation d'une forme dominante-négative de TCF4 (Δ NTCF4), connue pour bloquer l'activité du complexe β -caténine/TCF4, réduit significativement l'expression des gènes cibles du complexe β -caténine/TCF4 dans les cellules transformées par caMEK1. On observe aussi un renversement partiel de la transformation morphologique associée à l'EMT de même que la restauration d'une morphologie plus épithéliale. Nos résultats montrent que l'expression du Δ NTCF4 dans les cellules exprimant le mutant actif de MEK1 ralentit leur prolifération cellulaire, réduit leur capacité à croître en indépendance d'ancrage de même qu'à former des tumeurs chez la souris immunodéficiente. De plus, l'expression du mutant de TCF4 diminue la capacité migratoire et invasive des cellules transformées par caMEK1 et leur potentiel à former des métastases pulmonaires chez la souris. Ces résultats montrent donc que l'activation du complexe β -caténine/TCF4 contribue au potentiel tumorigénique des IEC-6 induit par caMEK1. Finalement, nos travaux montrent, pour la première fois, que la phosphorylation de LRP6 sur la sérine 1490 et la thréonine 1572 est augmentée dans une grande proportion de tumeurs humaines colorectales comparativement au tissu sain adjacent.

Abstract

Aberrant regulation of the Wnt/ β -catenin signaling pathway is one of the major causes of colorectal cancer (CRC). Loss-of-function mutations in *APC* are commonly found in CRC, leading to inappropriate activation of canonical Wnt signalling. Conversely, gain-of-function mutations in *KRAS* and *BRAF* genes are detected in up to 60% of CRCs. While KRAS/mitogen-activated protein kinase (MAPK) and canonical Wnt/ β -catenin pathways are critical for intestinal tumorigenesis, mechanisms integrating these two important signalling pathways during CRC development are unknown. Results herein demonstrate that transformation of normal intestinal epithelial cells (IEC) by oncogenic forms of KRAS, BRAF or MEK1 was associated with a marked increase in β -catenin/TCF4 and c-myc promoter transcriptional activities and mRNA levels of *c-myc*, *axin2* and *lef1*. Notably, expression of a dominant-negative mutant of TCF4 (Δ NTCF4) severely attenuated IEC transformation induced by oncogenic MEK1 and markedly reduced their tumorigenic and metastatic potential in immunocompromised mice. Interestingly, the Frizzled co-receptor LRP6 was phosphorylated in a MEK-dependent manner in transformed IECs and in human CRC cell lines. Expression of LRP6 mutant in which serine/threonine residues in each particular PPPS/TP motif were mutated to alanines (LRP6-5A) significantly reduced β -catenin/TCF4 transcriptional activity as well as cellular response to Wnt3a stimulation. Accordingly, MEK inhibition in human CRC cells significantly diminished β -catenin/TCF4 transcriptional activity and *c-myc* mRNA and protein levels without affecting β -catenin expression or stability. Lastly, LRP6 phosphorylation was also increased in human colorectal tumors, including adenomas, in comparison to healthy adjacent normal tissues.

Conclusion. Our data indicate that oncogenic activation of KRAS/BRAF/MEK signaling activates the canonical Wnt/ β -catenin pathway which in turn promotes intestinal tumor growth and invasion. Moreover, LRP6 phosphorylation by MAPKs may provide a unique point of convergence between MEK/ERK and Wnt/ β -catenin signalings during oncogenesis. **Keywords:** MAP Kinase, KRAS, Wnt/ β -catenin, intestinal epithelial cells, colorectal cancer

Introduction

Colorectal cancer (CRC) is a major cause of morbidity and mortality worldwide. Colorectal

carcinomas develop through a series of well-characterized histopathological changes resulting from specific mutations in a selected oncogenes and tumor suppressor genes. At least four sequential genetic changes need to occur to ensure CRC evolution (1). One oncogene, KRAS, as well as the tumor suppressor genes adenomatous polyposis coli (APC), SMAD4 and TP53, are the main targets of these genetic changes. Of particular note, mutations in the *APC* gene are responsible for familial adenomatous polyposis (FAP) and also play a rate-limiting role in the initiation of the majority of sporadic colorectal cancers. The major tumor suppressor function of the APC protein is thought to be as a negative regulator of Wnt signalling, where it forms part of the β -catenin destruction complex, comprising Axin, GSK3 β and CK1. Mutations in APC lead to the stabilization of β -catenin and consequently, to the deregulation of the Wnt pathway through the activation of TCF/LEF target genes such as *c-myc* (2). Several mouse cell lines, each carrying a different mutation in the *apc* gene, have been described (3). Most of these genetically modified mice show an intestinal tumor predisposition phenotype and develop few to many adenomas. Remarkably, c-myc deletion suppresses all the phenotypes of the APC tumor suppressor loss and halts intestinal regeneration (4,5).

KRAS is another important and frequently mutated gene during colorectal carcinogenesis. *KRAS* encodes a GTP-binding protein which, when mutated, loses inherent GTPase activity. Activating *KRAS* mutations are found in 35-42% of CRCs and in a similar number of advanced adenomas (6,7). Genetic and biochemical studies have firmly established the central role of KRAS-dependent signalling in regulating colorectal tumor cell proliferation, growth, survival, invasion and metastasis formation (7-9). The most studied KRAS effector pathways are the RAF-MEK-ERK Mitogen-Activated Protein kinase (MAPK) and the Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K)-AKT effector pathways (6,9) with inhibitors of components of both pathways currently under clinical evaluation (10,11). Further support for a functional role of these effectors in CRC growth stems from the identification of mutations activating *BRAF* (*BRAF*^{V600E}) or the p110 α catalytic subunit of PI3K (*PIK3CA*) in CRC (12-14). Since *KRAS* and *BRAF* mutations are mutually exclusive in colorectal tumors (15,16), aberrant activation of BRAF signalling is considered critical for KRAS-mediated colorectal oncogenesis (15).

BRAF relays its signals via the MAP kinase kinases MEK1 and MEK2 which in turn activate ERK MAP Kinases. Activated ERK1/2 then translocate into the nucleus where they phosphorylate and activate nuclear transcription factors such as Elk-1 and ETS1/2 resulting in immediate-early gene induction (17). Studies, including ours, on normal intestinal epithelial cells (IECs) in culture have demonstrated a close correlation between ERK1/2 activation and G1/S phase transition, while pharmacological or molecular inhibition of ERK abrogated cell proliferation (18-20). Notably, we previously localized activated forms of ERK in the nucleus of undifferentiated proliferative epithelial cells in human intestine (18) hence supporting the role of these kinases in crypt intestinal cell proliferation. The involvement of MEK1/2 signalling in intestinal tumorigenesis is also supported by a number of observations (20). First, MEK1/2 are phosphorylated and activated in 30-40% of adenomas and 76% of colorectal tumors (21,22). Second, expression of a constitutively active mutant of MEK1 or MEK2 in rodent normal IECs is sufficient to induce cell transformation, growth in soft agar, epithelial to mesenchymal transition (EMT) and formation of invasive metastatic tumors after their injection in nude mice (23-26). Third, synthetic MEK inhibitors inhibit intestinal polyp growth in *APC^{Min/+}* mice (22) and attenuate proliferation of human CRC cells in culture and in mouse xenografts (27). Taken together, these data strongly suggest that MEK/ERK signalling may contribute to colorectal carcinogenesis (20). However, the exact molecular mechanisms by which MEK/ERK signalling achieves such functions in the colon and rectum remain unclear.

In the present study, we demonstrate that oncogenic activation of KRAS/BRAF/MEK signalling in IECs activates the canonical Wnt/ β -catenin pathway which, in turn, promotes intestinal tumor growth, migration and invasion. Moreover, our results indicate that MEK-dependent phosphorylation of the Frizzled co-receptor LRP6 may serve as the link between these two important signalling pathways in CRC.

Results

Oncogenic KRAS and activated MEK1 induce EMT and perturb β -catenin localization.

Previous reports have demonstrated that expression of constitutively active mutants of MEK1 (caMEK) (24-26), BRAF (28,29) or KRAS (30) in intestinal epithelial cells (IECs) such as IEC-6 is sufficient to promote their transformation. As can be seen in Fig.1, phase-contrast microscopy confirmed that KRAS^{G12V} or caMEK-expressing IEC-6 cells had clearly lost their cell-cell contacts and exhibited a fibroblast-like appearance when compared to control cells (Fig. 1A). In addition, E-cadherin protein expression was markedly downregulated in KRAS^{G12V} and caMEK-transformed cells (Fig. 1B) suggesting that these cells have undergone an epithelial-mesenchymal transition, as previously detailed (24). As expected, treatment with the MEK inhibitor U0126 during 72 h efficiently rescued the epithelial phenotype of KRAS^{G12V} and caMEK-expressing IEC-6 cells (Fig. 1A, panel 3 and 6) and enhanced E-cadherin expression (Fig. 1B). β -Catenin links E-cadherin and α -catenin to the cytoskeleton to form a complex that maintains normal epithelial polarity and intercellular adhesion (31). Since E-cadherin is downregulated during EMT, we speculate that β -catenin will accumulate in the cytoplasm and translocate into the nucleus in IECs transformed by oncogenic MEK or KRAS signalling. We therefore examined the localization of β -catenin in our cell populations expressing or not caMEK (panels 4-6) or KRAS^{G12V} (panels 10-12). As shown in Fig. 1C, the control cells (wtMEK, panels 1-3 or pBabe, panels 7-9) showed typical honeycomb β -catenin staining as the parental IEC-6 (24). By contrast, after expression of activated MEK (panels 4-6) or oncogenic KRAS (panels 10-12), cells have changed their morphology and β -catenin decreased from cell-cell contacts, increasing in both the cytoplasm and in the nucleus (merged images show colocalization with DAPI, panels 6 and 12).

Induction of β -catenin/TCF complex transcriptional activity in IECs transformed by oncogenic KRAS or MEK1.

Since nuclear β -catenin staining was observed in IECs transformed by oncogenic KRAS or activated MEK1, possible modulation of β -catenin/TCF transcriptional activity was investigated. Cells were thereby transfected with the TOPFLASH reporter, which directly

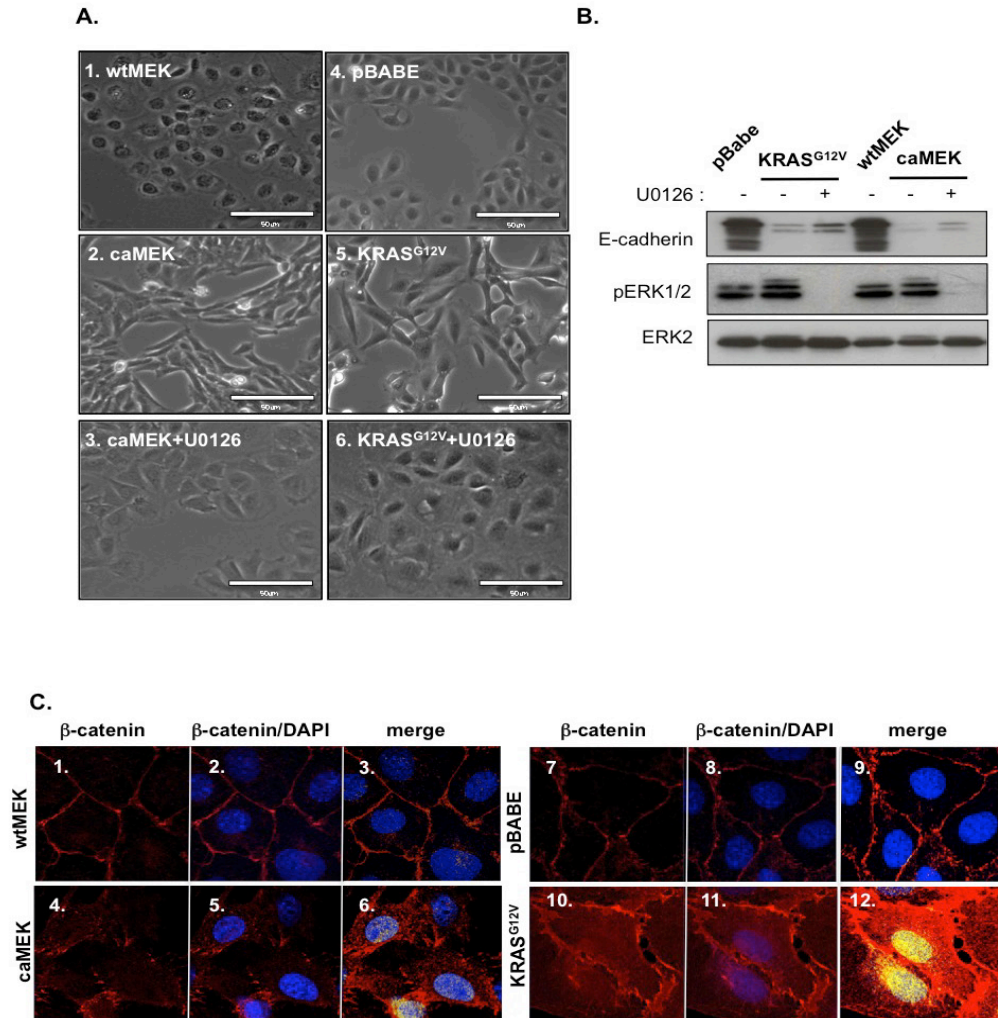


Figure 1. Oncogenic KRAS and activated MEK1 induce EMT and perturb β -catenin localization. **A)** Representative phase-contrast microscopy images of IEC-6 cells expressing pBabe (empty vector), KRAS^{G12V}, wtMEK or caMEK, and treated or not with 20 μ M U0126 during 24 h. **B)** Equal amounts of whole cell lysates were separated by 10% SDS-PAGE and proteins analyzed by Western blotting with specific antibodies against E-cadherin, phosphorylated ERK1/2 and ERK2. **C)** IEC-6 cells stably expressing wtMEK (panels 1-3) or caMEK (panels 4-6) pBabe (panels 7-9) or KRAS^{G12V} (panels 10-12) were fixed for immunofluorescence and stained for β -catenin protein (red) and DAPI (blue). Panels 3, 6, 9, 12 : Full overlap of the fluorescence signals (yellow). Representative immunofluorescence images are shown.

assays β -catenin/TCF activity. As shown in Fig. 2A, β -catenin/TCF4 transcriptional activity was found to be significantly enhanced in cells transformed by oncogenic KRAS or MEK1 in comparison to their respective controls. Of note, addition of Wnt3a to KRAS-transformed cells further induced TOPFLASH activity, the latter occurring in a MEK-dependent manner

(Fig. S1). Transcriptional activation of *c-myc* is often used as a Wnt readout since its promoter contains β -catenin/TCF response elements (32). Indeed, similarly to TOPFLASH activity, the *c-myc* promoter activity was also significantly increased in KRAS^{G12V} and caMEK-transformed IECs (Fig. 2B). QPCR and Western blot analyses confirmed the significant MEK-dependent induction of *c-myc* mRNA and protein levels in cells transformed by activated MEK1 or KRAS^{G12V} (Fig. 2C and D). The β -catenin/TCF complex regulates expression of several other genes including *axin2* and *lef1* (33). QPCR analyses demonstrated that expression of oncogenic KRAS or MEK1 increased expression levels of both *axin2* and *lef1* genes (Fig. 2E and F). These inductions were again dependent of MEK activity since they were abrogated by U0126 treatment. Overall, these data indicate that nuclear β -catenin/TCF complex activity is activated upon oncogenic activation of KRAS/MAPK signalling in IECs.

Attenuation of caMEK-driven morphological transformation of IECs occurs upon interference with the β -catenin/TCF4 complex.

To test the hypothesis that the activation of β -catenin/TCF4 complex is required for transformation induced by oncogenic KRAS/MEK signalling, a dominant-negative TCF4 mutant (Δ NTCF4) was overexpressed in cells transformed by activated MEK1. This NH₂-terminally deleted mutant lacks the β -catenin-interaction domain and has been shown to interfere with the activity of the endogenous, constitutively active, β -catenin/TCF4 complex present in CRC cells (34,35). Accordingly, caMEK1-expressing cells transfected with the Δ NTCF4 construct exhibited significant attenuation of the transcriptional activity of β -catenin/TCF complex and *c-myc* promoter (Fig. 3A). Furthermore, Western blot analyses confirmed the reduction in *c-myc* and Fra-1 proteins following the expression of the Δ NTCF4 mutant in caMEK cells (Fig. 3B). Of note, expression of E-cadherin protein was also partially restored upon expression of the TCF4 mutant (Fig. 3B). In addition, when Δ NTCF4 was expressed, the caMEK-transformed cells showed a partial reversion to an epithelial morphology (Fig. 3C). As illustrated in Fig. 3D, similar results were obtained after treatment of caMEK-transformed cells with ICG-001, a small-molecule antagonist of β -catenin/TCF-mediated transcription (36).

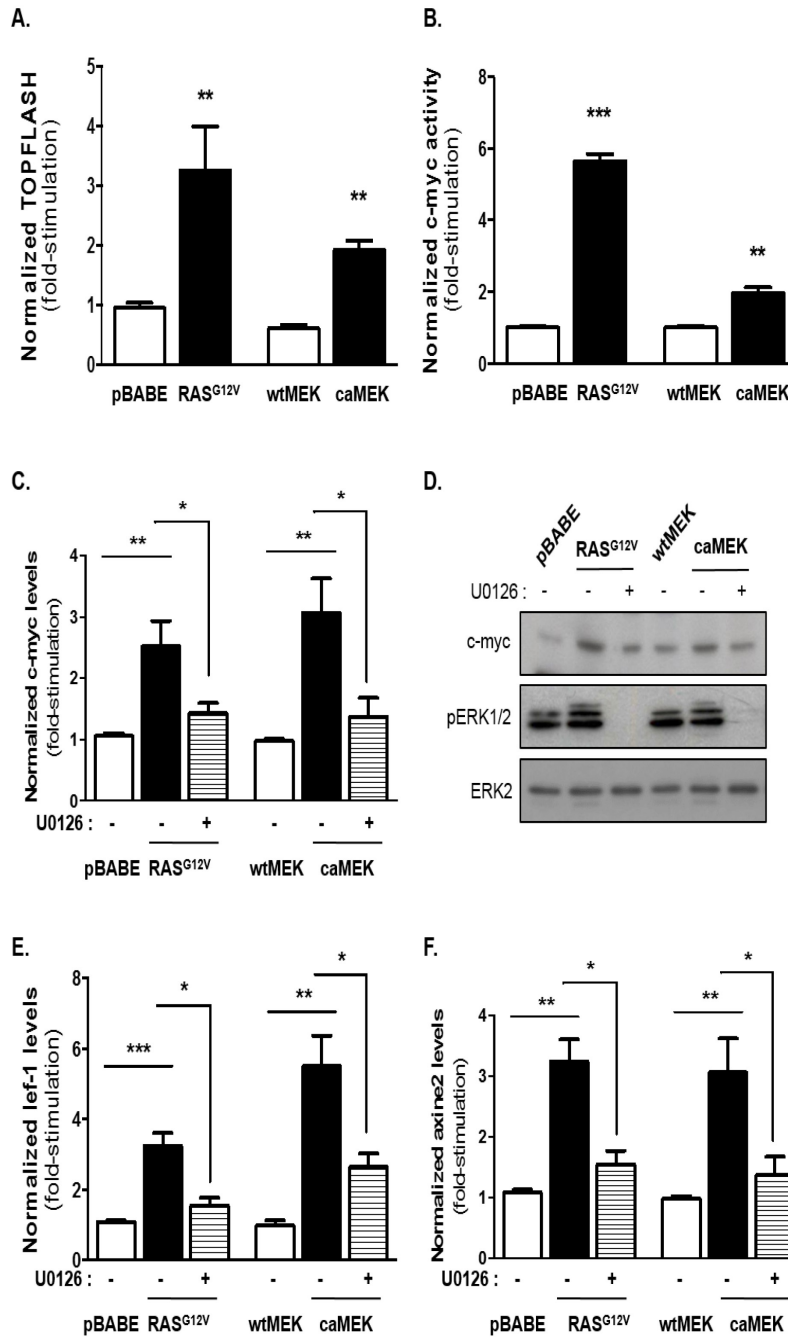


Figure 2. Induction of β -catenin/TCF complex transcriptional activity in IECs transformed by oncogenic KRAS or MEK1. A) and B) IEC-6 cells stably expressing pBabe, KRAS^{G12V}, wtMEK or caMEK were transfected with 0.3 μ g of TOPFLASH/FOPFLASH reporter genes (A) or c-myc/c-mut (4x TBE2-wt/4x TBE2-mut) luciferase reporters. (B) 36 h after transfection, cells were lysed and luciferase activity was measured. The increase in luciferase activity was calculated relative to the level observed in pBabe-expressing cells which was set at 1. Values were also normalized with Renilla-luciferase vector. Results are the mean \pm SE of at least 3 separate experiments. Significantly different from respective control at * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ or *** $p < 0.001$ (Student's t test). C) and D) Cells expressing pBabe, KRAS^{G12V}, wtMEK or caMEK were treated or not with 20 μ M U0126 during 24 h.

Thereafter, cells were lysed and mRNA were analyzed by quantitative real-time PCR for expression of c-myc (D) and proteins were analyzed by Western blotting for the expression of c-myc, phosphorylated ERK1/2 and total ERK2. E) and F) Cells expressing pBabe, KRAS^{G12V}, wtMEK or caMEK were treated or not with 20 μ M U0126 during 24 h. Thereafter, cells were lysed and mRNA were analyzed by quantitative real-time PCR for expression of *axin2* and *lef1*.

Expression of Δ NTCF4 inhibits proliferative, tumoral and invasive properties of cells transformed by activated MEK1.

To determine the importance of the β -catenin/TCF complex in the oncogenicity of activated MEK1 in IECs, we first assessed the proliferation rate of caMEK cells expressing or not the Δ NTCF4 mutant. As shown in Fig. 4A, expression of the TCF4 mutant significantly slowed the proliferation of caMEK-transformed cells without affecting proliferation of control wtMEK-expressing cells. Furthermore, Δ NTCF4 expression strongly diminished the ability of caMEK cells to form colonies in soft agarose (Fig. 4B). The effect of Δ NTCF4 expression was also determined on migration and invasion of caMEK-transformed cells in the presence of 20 μ M hydroxyurea, a pharmacological inhibitor of the cellular ribonucleoside reductase, known to arrest the cell cycle in G1/S phase. As shown in Fig. 4C and D, Δ NTCF4 expression in caMEK-expressing cells significantly reduced their capacity to migrate and to invade Matrigel. The tumorigenicity of these cell populations *in vivo* was subsequently assessed after subcutaneous injection into the flanks of nude mice. As shown in Fig. 4E, caMEK-expressing cells induced palpable tumors with a short latency period of 1 week after injection. Interestingly, co-expression of Δ NTCF4 clearly impaired their capacity to grow as tumors in nude mice. Lastly, we investigated whether Δ NTCF4 expression alters the capacity of caMEK1 cells to form metastases in an experimental metastasis assay. Nude mice injected with caMEK cells into the tail vein showed extensive lung metastasis within 28 days, whereas caMEK cells expressing Δ NTCF4 exhibited attenuated lung colonization (Fig. 4F). Taken together, these data indicate that inhibition of β -catenin/TCF4 activity reduces the oncogenic properties of constitutive MEK signalling in IECs.

Inhibition of MEK activity in human CRC cell lines significantly reduces β -catenin/TCF complex activity.

To evaluate whether KRAS/MAPK signalling regulates the β -catenin/TCF complex in human cell models, we analyzed the impact of MEK inhibitor on the activity of TOPFLASH reporter activity and *c-myc* expression in two human CRC cell lines, namely HT-29 and DLD-1, which have an activating mutation in the *BRAF* and *KRAS* genes respectively. As shown in Fig. 5A, treatment of these CRC cell lines with U0126 markedly

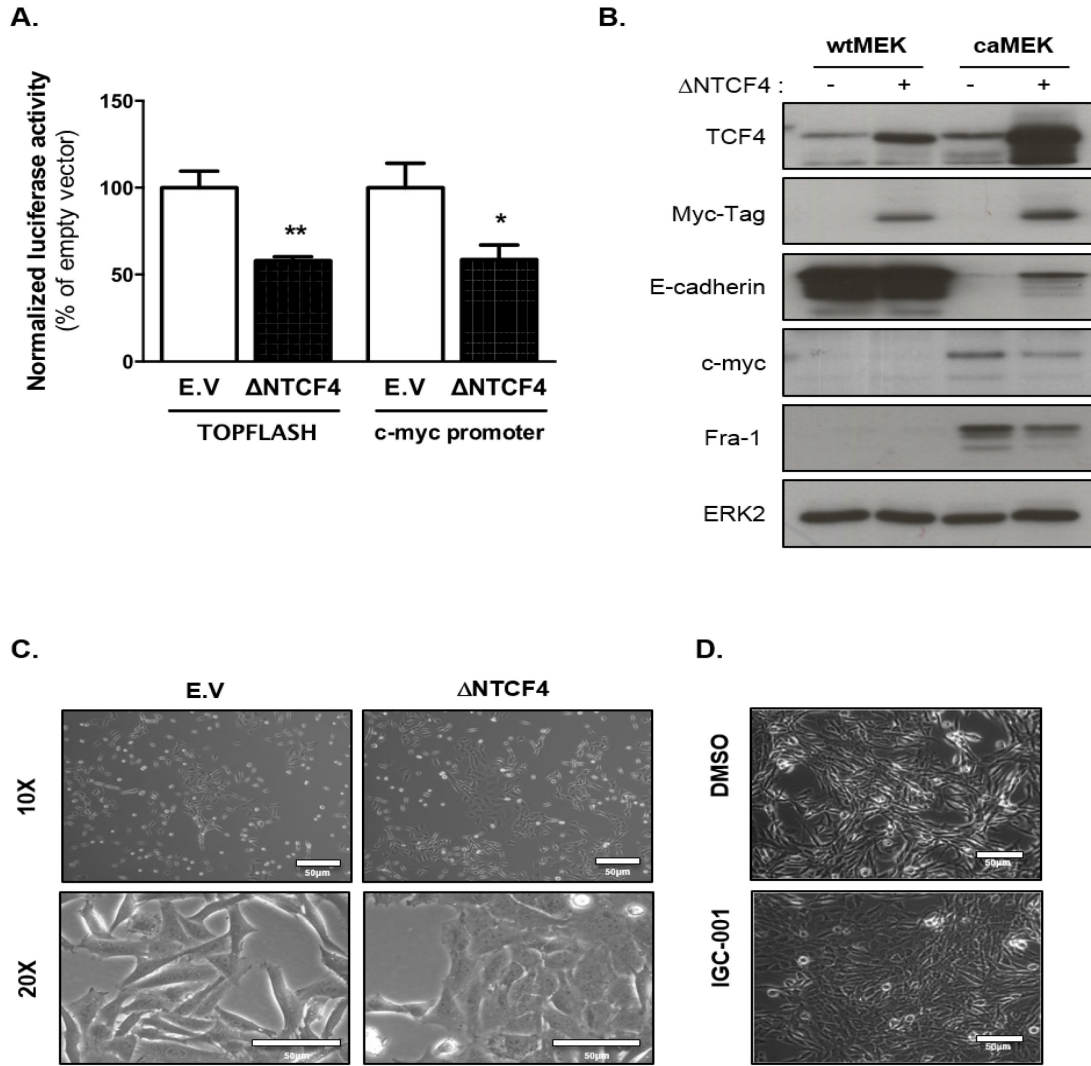


Figure 3. Attenuation of caMEK1-driven morphological transformation of IECs occurs upon interference with the β -catenin-TCF4 complex. A) Subconfluent IEC-6 wtMEK or caMEK cells stably expressing a dominant-negative form of TCF4 (Δ NTCF4) or the empty vector (E.V) were transfected with 0.3 μ g of the TOPFLASH/FOPFLASH reporter genes and c-myc/c-mut (4x TBE2-wt/ 4x TBE2-mut) luciferase reporters. 36 h after transfection, cells were lysed and luciferase activity was measured. The luciferase activity was calculated relative to the level observed in E.V.-expressing cells which was set at 100%. Values were also normalized with Renilla-luciferase vector. Results are the mean \pm SE of at least 3 separate experiments. Significantly different from respective control at * $p < 0.05$ or ** $p < 0.01$ (Student's t test). B) Equal amounts of lysates from IEC-6 wtMEK or caMEK cells stably expressing Δ NTCF4 or E.V. were separated by SDS-PAGE, and proteins analyzed by Western blotting with specific antibodies against TCF4, c-myc, Fra-1, c-myc, E-cadherin and total ERK2. C) Representative phase-contrast microscopy pictures of IEC-6 caMEK expressing Δ NTCF4 or E.V. (as control). D) Representative phase contrast microscopy pictures of IEC-6 caMEK that were treated or not with 7.5 μ M ICG-001 during 36 h.

and significantly reduced TOPFLASH activity as well as c-myc mRNA levels (Fig 5B), indicating that expression of β -catenin/TCF complex activity was likely dependent on MEK activity in these cells. Western blot analyses demonstrated that MEK inhibition also reduced c-myc protein levels in both cell lines without, however, affecting E-cadherin and β -catenin expression (Fig. 5C).

To elucidate the molecular mechanisms by which MEK inhibition reduced β -catenin/TCF transcriptional activity in human CRC cells, β -catenin subcellular distribution was also verified. Since the majority of CRC cells exhibit *APC* mutations (37), it was therefore expected that these cells would exhibit some nuclear β -catenin staining. In particular, *APC* is deleted at the carboxyl terminus at residue 1427 in DLD-1 cells and at residue 1555 in HT-29 cells (38). Interestingly, control HT-29 cells showed β -catenin staining predominantly in the cytoplasm and also in the nucleus. However, the nuclear staining of β -catenin was markedly reduced upon MEK inhibition while the membranous signal seemingly accumulated in areas of intercellular contacts (Fig. 5D). Similar results were obtained in DLD-1 cells (Fig. S2). Co-immunoprecipitation assays further demonstrated that the β -catenin/TCF4 association was indeed clearly reduced following MEK inhibition in these cells (Fig. 5E). By contrast, we could not detect modified interaction of β -catenin with E-cadherin in U0126-treated cells (Fig. 5F).

LRP6 is phosphorylated in a MEK-dependent manner in human CRC cells and in IECs expressing oncogenic KRAS, BRAF or MEK1.

Since nuclear localization of β -catenin was reduced following MEK inhibition in CRC cells, we first speculated that this could potentially be associated with certain changes in β -catenin phosphorylation. Indeed, phosphorylation of β -catenin modulates its interaction with critical components of adherens junctions as well as regulates its subcellular localization. For instance, casein kinase 1 α phosphorylates β -catenin on serine-45, providing a recognition site for GSK3 β and allowing GSK3 β to phosphorylate β -catenin at threonine-41, serine-37 and serine-33 (38). Phosphorylated β -catenin can then be recognized by β -Trcp and targeted for ubiquitination and degradation (39). In addition, both Fer and Fyn kinases phosphorylate tyrosine-142 *in vitro* and overexpression of these

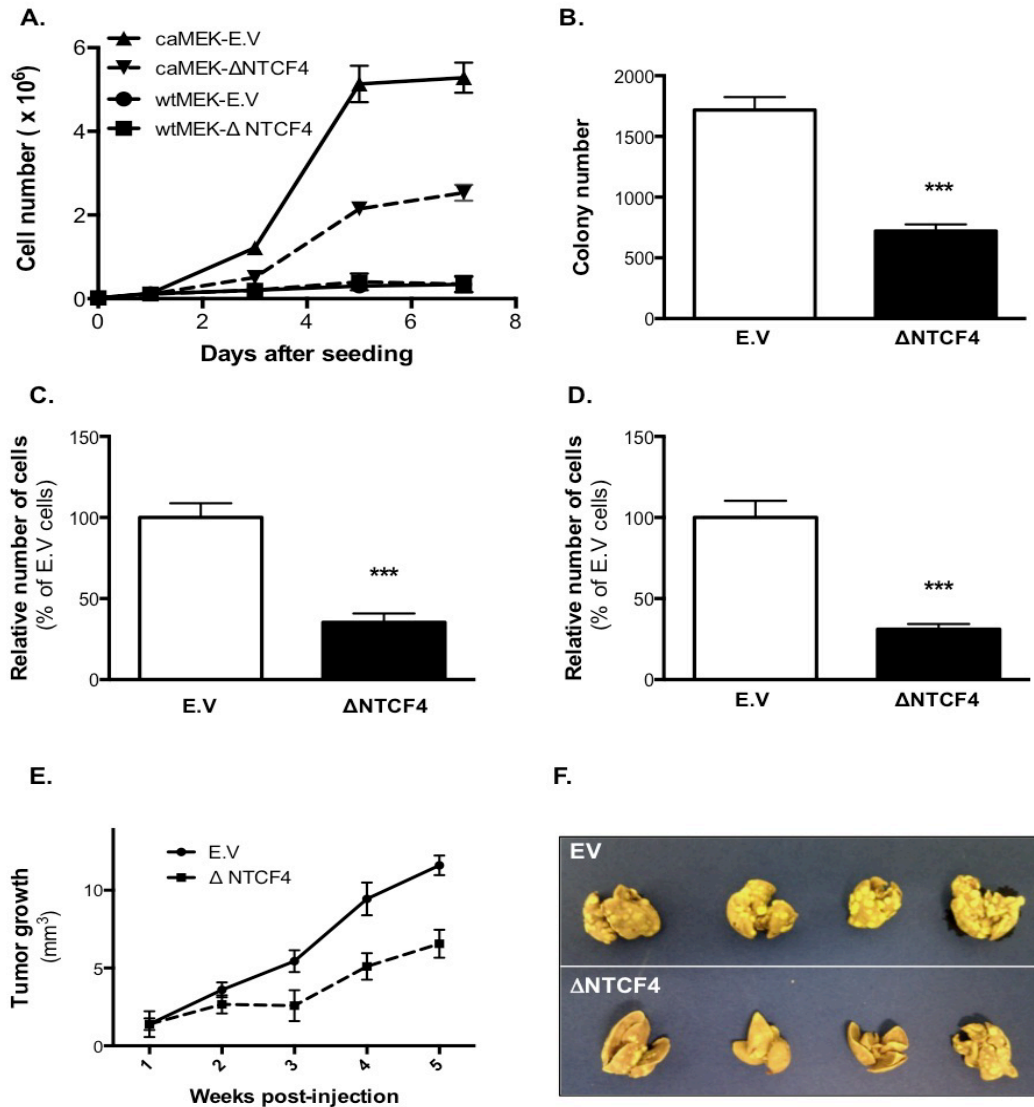


Figure 4. Expression of Δ NTCF4 inhibits proliferative, tumoral and invasive properties of cells transformed by activated MEK1. **A)** IEC-6 caMEK cells stably expressing Δ NTCF4 or E.V (as control) were seeded and the number of cells counted during 7 days. **B)** IEC-6 caMEK cells stably expressing Δ NTCF4 or E.V were cultured in soft agarose for 3 weeks before MTT staining. The number of colonies was calculated using Image J software. **C)** Invasion capacity of IEC-6 caMEK cells stably expressing Δ NTCF4 or E.V through Matrigel was studied using Matrigel-coated Transwells during 48 h. Thereafter, cells were fixed and stained with 0.5% crystal violet solution. **D)** Migration of IEC-6 caMEK cells stably expressing Δ NTCF4 or E.V to the undersurface of the polycarbonate membrane of Boyden chambers was evaluated 24 h after seeding, in presence of 20 μ M hydroxyurea. The number of cells in (C) and (D) was determined in ten fields, the experiments performed in duplicate and the number of E.V-expressing cells which had migrated was set at 100%. Significantly different from respective control at *** $p < 0.001$ (Student's t test). **E)** Tumor growth over time was measured after subcutaneous injection of 2×10^6 of IEC-6 caMEK cells stably expressing Δ NTCF4 or E.V. The results

represent the mean tumor volume obtained from at least six mice injected for each cell line. Independent experiments were performed twice. **F)** Representative digital images of mouse lungs 21 days after tail vein injection of 10^6 IEC-6 caMEK cells expressing E.V or Δ NTCF4. Similar results were obtained in two independent experiments.

tyrosine kinases in epithelial cells disrupts interactions between α and β -catenins (40). The phosphorylation of tyrosine-142 has been shown to act as a switch from the transcriptional to the adhesive role of β -catenin (41). Src family kinases can also phosphorylate tyrosines-86 and 654 on β -catenin, but only tyrosine-654 phosphorylation regulates β -catenin binding to E-cadherin (42). Finally, both Akt and PKA have been shown to phosphorylate β -catenin at serine-552 which is associated with its accumulation in the nucleus and increased transcriptional activity (43-45). Therefore, by using several phospho-specific antibodies, we verified whether β -catenin phosphorylation was changed upon MEK inhibition in CRC cells. As shown in Fig. 6A, treatment of CRC cells with U0126 during 24 h did not alter β -catenin expression nor its phosphorylation on these various phosphorylation sites known to regulate its stability or subcellular localization.

Upon examining the Wnt/ β -catenin pathway for components that could be modulated by the MEK/ERK pathway, the Wnt co-receptor LRP6 was found to be phosphorylated on serine-1490 and threonine-1572 in a MEK-dependent manner in both CRC cells (Fig. 6B) and IECs transformed by oncogenic KRAS and MEK1 (Fig. 6C). Indeed, ERK kinases have recently been shown to activate the Wnt/ β -catenin signalling via phosphorylation of LRP6 on these sites (46). LRP6 phosphorylation was also markedly enhanced in IEC-6 cells transformed by the inducible BRAF:ER fusion protein (2.5 fold after 16 h of 4-hydroxytamoxifen). Of note, the induction of LRP6 phosphorylation was induced within 1 h following ERK activation (Fig. 6D). Again, treatment with the MEK inhibitor U0126 completely abrogated LRP6 phosphorylation induced by oncogenic BRAF indicating that induction of LRP6 phosphorylation is an early and direct event occurring following the activation of ERK signalling.

Finally, wild-type LRP6 was transiently co-expressed with the activated mutated forms of MEK1 or KRAS in 293T cells and analyzed for phosphorylation on serine-1490 and

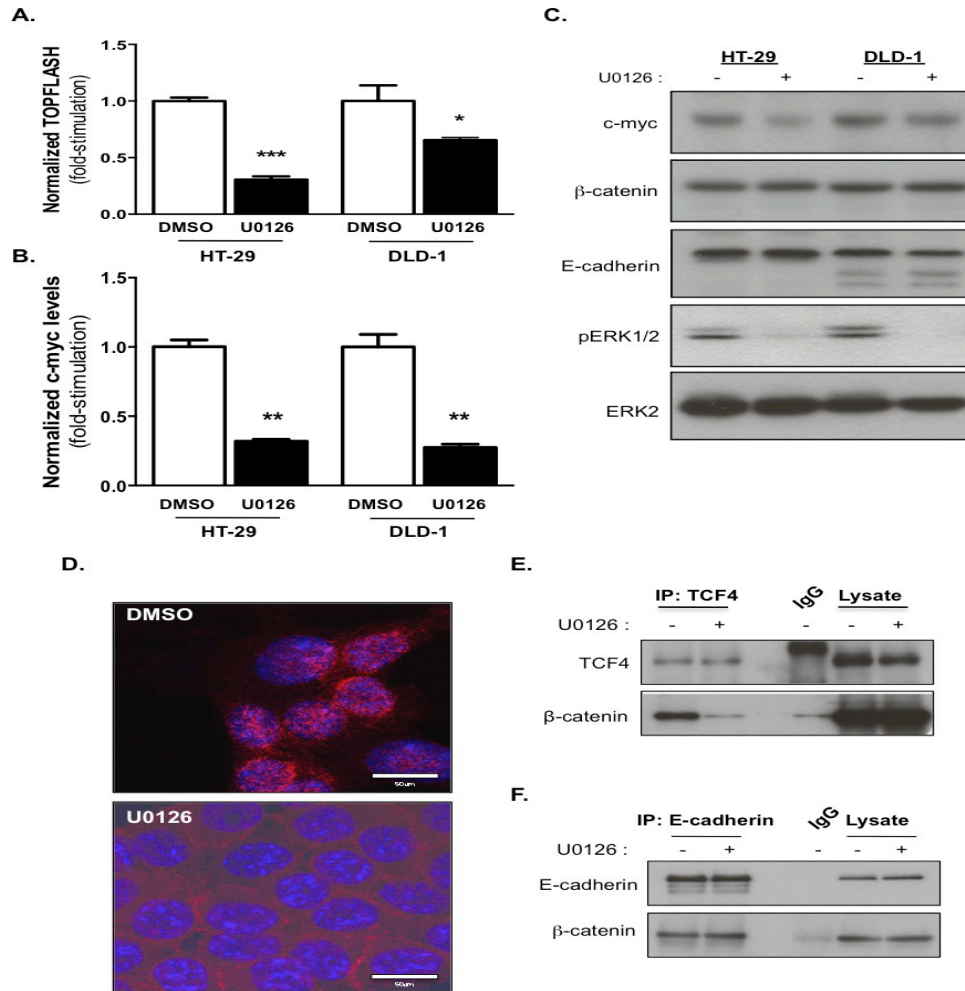


Figure 5. Inhibition of MEK activity in human CRC cell lines significantly reduces β -catenin/TCF complex activity. **A)** Subconfluent DLD-1 and HT-29 cells were transfected with 0.3 μ g of the TOPFLASH/FOPFLASH luciferase reporter vectors. 12 h after transfection, cells were treated or not with 20 μ M U0126 during 24 h after which luciferase activity was measured. The luciferase activity was calculated relative to the level observed in DMSO-treated cells which was set at 1. The luciferase activity was also normalized with Renilla-luciferase vector. Results are the mean \pm SE of at least 3 separate experiments. Significantly different from untreated cells at * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ or *** $p < 0.0001$ (Student's t test). **B) and C)** HT-29 and DLD-1 cells were treated or not with 20 μ M U0126 during 16 h after which c-myc mRNA levels were evaluated by quantitative real-time PCR while proteins were analyzed by Western blotting with specific antibodies against c-myc, β -catenin, E-cadherin, phosphorylated ERK1/2 and total ERK2. **D)** HT-29 cells were treated during 16 h with 20 μ M U0126. Thereafter, cells were fixed for immunofluorescence and stained for β -catenin protein (red) and DAPI (blue). **E) and F)** cells were treated during 16 h with 20 μ M U0126. Thereafter, 800 μ g of cell lysates were immunoprecipitated with non-target IgG (negative control), anti-TCF4 (E) or anti-E-cadherin (F) antibodies. Proteins from immunoprecipitates were solubilized in Laemmli's buffer, separated by 7.5% SDS-PAGE and analyzed by Western blotting to determine β -catenin association. IP: immunoprecipitation.

threonine-1572. As shown in supplemental Fig. S3, LRP6 phosphorylation on serine-1490 and particularly threonine-1572 were both increased by the expression of oncogenic MEK1 or KRAS. Again, phosphorylation was dependent on MEK activity since it was reduced to control levels (cells expressing wild-type MEK1, lane 1) by the U0126 compound. 293T cells were also transfected with a LRP6 mutant in which its serine/threonine residues in each particular PPPS/TP motif was replaced by alanine (LRP6-5A). As expected, phosphorylation of serine-1490 and threonine-1572 was never detected with this mutant (Fig. S3, lanes 7 and 8).

Oncogenic KRAS signalling triggers β -catenin/TCF4 complex activation via LRP6 phosphorylation,

To analyze whether MEK-dependent LRP6 phosphorylation was responsible for the increased β -catenin/TCF4 activity observed in cells transformed by oncogenic activation of KRAS signalling, IECs transformed by oncogenic KRAS were transfected with an increasing amount of wild-type LRP6 or LRP6-5A mutant. As illustrated in Fig. 7A, expression of wild-type LRP6 increased TOPFLASH luciferase activity in KRAS-transformed cells in dose-dependent manner. By contrast, expression of LRP6-5A mutant reduced TOPFLASH activity in KRAS cells, acting in a dominant-negative manner. Similarly, LRP6-5A abrogated BRAF^{V600E}-induced TOPFLASH activity following tamoxifen stimulation of IEC-6 cells expressing the BRAF:ER fusion protein (Fig. 7B).

LRP6 phosphorylation on serine-1490 and threonine-1572 is increased in colorectal tumors.

MEK/ERK signalling is thought to be affected in early stages of CRC formation due to frequent mutations in *KRAS* or *BRAF* (47). Thus, we first verified the expression and phosphorylation status of LRP6 in human colorectal adenomas, all of which exhibit *APC* inactivating mutations (exon 15) in combination with *KRAS* (G12D, G13D, Q61H) or *BRAF* (V600E) activating mutations. As shown in Fig. 8A, all adenomas displayed significantly higher phosphorylation levels of LRP6 on both serine-1490 and threonine-1572 in comparison to their corresponding benign epithelium (resection margin). Densitometric analysis confirmed the increased ratio of phosphorylated LRP6 relative to

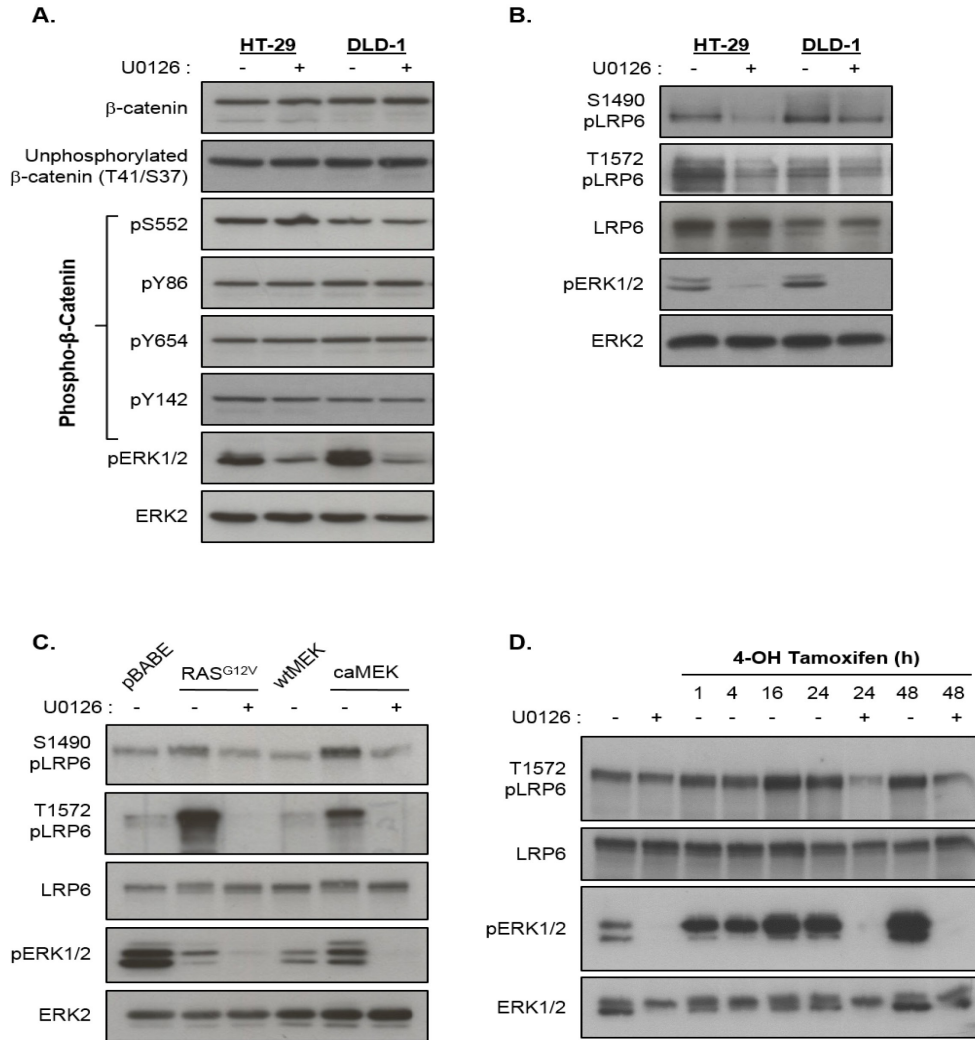


Figure 6. LRP6 is phosphorylated in a MEK-dependent manner in human CRC cells and in IEC-6 expressing oncogenic KRAS, BRAF or MEK1. A) and B) DLD-1 and HT-29 cells were treated or not (DMSO) with 20 μ M U0126 during 16 h and equal amounts of cell lysates were separated by SDS-PAGE. In A), proteins were analyzed by Western blotting for expression of β -catenin phosphorylated on serine-552, tyrosine-86, tyrosine-654 and tyrosine-142 with phospho-specific antibodies. Additionally, β -catenin unphosphorylated on serine-37 and threonine-41 was also analyzed by a specific antibody as well phosphorylated ERK1/2 and total ERK2. In B), proteins were analyzed by Western blotting for expression of total LRP6 and LRP6 phosphorylated on serine-1490 and threonine-1572. C) Equal amounts of lysates from IEC-6 pBabe, KRAS^{G12V}, wtMEK and caMEK expressing cells treated or not with 20 μ M U0126 during 24 h were analyzed by Western blotting for the expression of total ERK2, phosphorylated ERK1/2, total LRP6 and LRP6 phosphorylated on serine-1490 and threonine-1572. D) IEC-6 BRAF^{V600E}ER cells were stimulated were not with 250 nM tamoxifen in presence or absence of 20 μ M U0126 at the indicated times. Proteins were analyzed by Western blotting for the expression of total ERK2, phosphorylated ERK1/2, total LRP6 and LRP6 phosphorylated on threonine-1572.

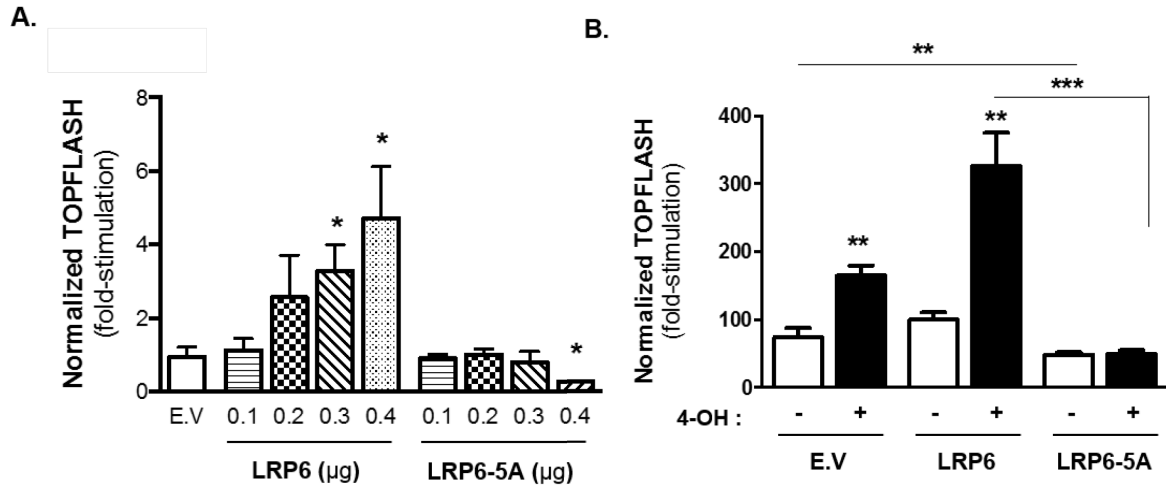
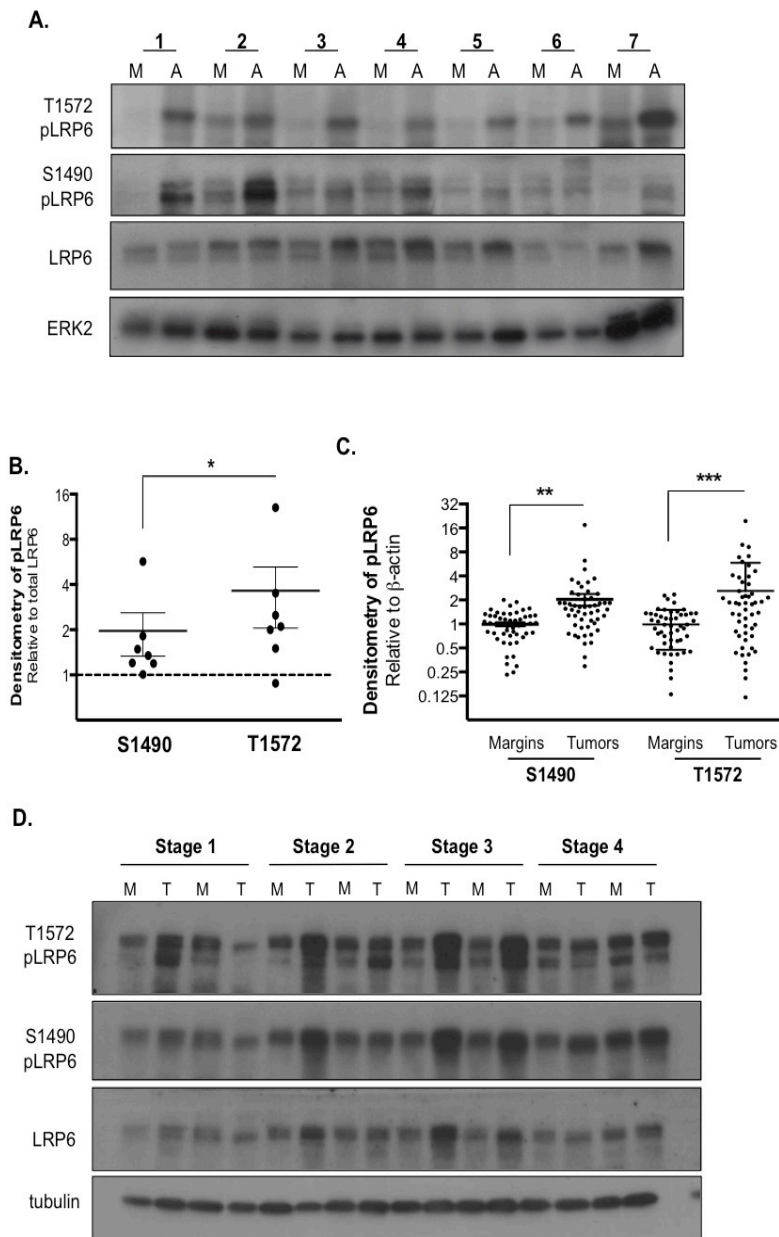


Figure 7. Oncogenic KRAS signalling triggers β -catenin/TCF4 complex activation via LRP6 phosphorylation. A) IEC-6 KRAS^{G12V} cells were co-transfected with 0.3 μ g of luciferase TOPFLASH/FOPFLASH reporters and different concentrations of plasmids expressing or not (E.V., empty vector), wild-type LRP6 or LRP6-5A mutant. 24 h after transfection, cells were lysed and luciferase activity was measured. The increase in luciferase activity was calculated relative to the level observed in E.V.-expressing cells which was set at 1. Values were also normalized with Renilla-luciferase vector. Results are the mean \pm SE of at least 3 separate experiments. B) IEC-6 BRAF^{V600E} ER were co-transfected with 0.3 μ g of luciferase TOPFLASH/FOPFLASH reporters and 0.4 μ g of plasmids expressing or not (E.V., empty vector) wild-type LRP6 or LRP6-5A mutant. 24 h after transfection, cells were stimulated or not with 250nM tamoxifen for an additional 24h and then, luciferase activity measured as described in (A). Significantly different from untreated cells at * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ or *** $p < 0.0001$ (Student's t test).

total LRP6 expression (Fig.8B). Similar increase in LRP6 phosphorylation was also observed in a series of advanced colorectal tumors (n=53) in comparison to their corresponding normal margins (Fig.8C). Lastly, no significant association was observed between increased LRP6 phosphorylation and tumor stage or grade (not shown). Representative Western blot analysis on 16 tumors at different stage is shown in Fig. 8D.

Figure 8. LRP6 phosphorylation on serine-1490 and threonine-1572 is increased in colorectal adenomas and tumors.



A) Expression of total ERK2, LRP6 and phosphorylated LRP6 on serine-1490 and threonine-1572 was investigated by Western blot in 7 paired colorectal adenomas (M: normal margins and A: adenomas). **B)** Levels of phosphorylated LRP6 were normalized to the levels of total LRP6 levels in each tissue specimen. Tumor relative phosphorylated/total LRP6 ratios were matched as reference to its normal samples (set at 1) resulting in a dimensionless value (arbitrary units-AU). Analyzed by paired t-test and * indicates significantly different from normal margins at $p \leq 0.05$. **C)** Expression of LRP6 and phosphorylated LRP6 on serine-1490 and threonine-1572 was

further investigated in a series of 53 paired specimens (M: resection margins and T: primary tumors) by Western blot. Expression levels of phosphorylated LRP6 on serine 1490 and 1572 were normalized to the intensity β -actin expression and to a reference sample, resulting in a dimensionless value (arbitrary units-AU). Densitometry of LRP6 phosphorylation in tumor tissues relative to their matched normal samples were analyzed by paired t-test. Significantly different from healthy resection margins ** $p \leq 0.005$; *** $p \leq 0.001$. **D)** Representative immunoblot analysis of total LRP6 and LRP6 phosphorylated on threonine 1572 and serine 1490 performed on protein extracts from eight paired resection margins and advanced tumors. Tubulin expression is shown as a control of protein loading.

Discussion

Gain-of-function mutations in *KRAS* and *BRAF* genes are detected in up to 60% of colorectal tumours at a relatively early stage of the carcinogenic process (48). Despite extensive research, the primary reason for this high frequency remains unclear. Efforts to develop anti-RAS therapies have mostly focused on *KRAS* downstream effector pathways. The non overlapping occurrence of *BRAF* and *KRAS* mutations suggests that aberrant BRAF downstream signalling is a critical mechanism for KRAS-mediated oncogenesis in CRC (49). In this regard, expression of human oncogenic forms of KRAS (KRAS^{G12V}) and BRAF (BRAF^{V600E}) induces transformation of normal IECs in culture (28,50). Similarly, we and others have also shown that expression of a constitutively active mutant of MEK1 or MEK2 in normal IECs is sufficient to induce morphological transformation, anchorage-independent growth and tumorigenicity in mice (23-26). Importantly, aberrant activation of KRAS/BRAF/MEK signalling in IECs triggers EMT characterized by the loss of epithelial polarity and expression of junctional proteins, particularly E-cadherin (Fig. 1) (24,29).

The cadherin/catenin-based adhesion system is the major means by which epithelial cells adhere to one another (51). β -catenin, a central structural component of this adhesion complex, also acts as a transcriptional co-activator in the Wnt signalling pathway in epithelial cells (33). Despite this finding, there has been much speculation over whether the cadherin-bound and signal transduction pools of β -catenin are functionally interchangeable (52-56). In the present study, we show that the nuclear transcriptional activity of β -catenin was enhanced upon sustained oncogenic stimulation of normal IECs by KRAS, BRAF or MEK. Importantly, expression of a dominant-negative TCF4 mutant that inhibits β -catenin/TCF4 transactivation severely attenuated morphological transformation and tumorigenic potential induced by oncogenic MEK1. Taken together, these data suggest KRAS/MAPK signalling may utilize the Wnt/ β -catenin pathway to induce transformation of IECs.

In keeping with these results, the transcriptional activity of β -catenin/TCF complex was reduced by MEK inhibitors in human CRC cell lines, suggesting that MEK activation also potentiates Wnt signalling in CRC. Interestingly, these effects were evident despite the

presence of *APC* mutations. This is consistent with the recent observation that Wnt signalling components are significantly enriched in KRAS-dependent CRC cells compared to KRAS-independent cells, despite both classes having comparable *APC* mutations (57). Accordingly, Horst et al. (58) showed that forced expression of the KRAS oncogene in the Caco-2 CRC cell line leads to nuclear accumulation of β -catenin and increases Wnt activity whereas blocking the tyrosine kinase receptor EGFR, an activator of MAPK signalling, has the converse effect. Additionally, the authors observed co-localization of nuclear β -catenin and phosphorylated ERK staining in primary colon tumor xenografts. Likewise, Phelps et al. recently reported that KRAS and RAF1 oncogenes promote nuclear accumulation of β -catenin in APC-deficient cells (59). Overall, these studies reveal that the KRAS/MAPK pathway can regulate β -catenin signalling in human CRC cells.

Very few studies have explored the molecular mechanisms underlying the enhancement of β -catenin transcriptional activity by oncogenic RAS/MAPK signalling. Oncogenic KRAS signalling could increase the stability of β -catenin (22) through its phosphorylation at serine 552 (45). However, we found in CRC cells that MEK inhibition reduced β -catenin accumulation into the nucleus and its interaction with TCF4 without affecting its global expression, its phosphorylation on serine 552 (or residues 37, 41, 86, 142 and 654) or its stabilization (data not shown). On the other hand, although the down-regulation of E-cadherin on the cell membrane may contribute to nuclear β -catenin accumulation upon oncogenic activation of KRAS/MAPK signalling in normal IECs (the present study; (60)), additional mechanisms most likely be involved in human CRC cells since E-cadherin and β -catenin expression remained unaltered following MEK inhibition. Interestingly, we observed that the Frizzled co-receptor LRP6 was phosphorylated on serine-1490 and threonine-1572 in a MEK-dependent manner in human CRC cells. Furthermore, MEK-dependent phosphorylation of LRP6 was also observed upon sustained oncogenic activation of KRAS, BRAF and MEK1 in IECs, thus providing a mechanism integrating KRAS/MAPK and canonical Wnt/ β -catenin signalling during intestinal transformation. Of note, both the serine-1490 and threonine-1572 residues are localized within the PPPS/TP motifs of the LRP6 co-receptor, motifs which are required for Wnt/ β -catenin signal transduction. Indeed, removal of any of the five PPPS/TP motifs impairs Wnt signalling

while removal of all five motifs results in complete loss of signalling (61,62). Thus, given their importance, the PPPS/TP motifs may represent a major site for modulation of the Wnt/ β -catenin pathway by other signalling systems. In this respect, we found that expression of LRP6-5A, a mutant in which its serine/threonine residues in each particular PPPS/TP motif is replaced by alanine (LRP6-5A), markedly reduced TOPFLASH activation in KRAS^{G12V} and BRAF^{V600E}-transformed IECs.

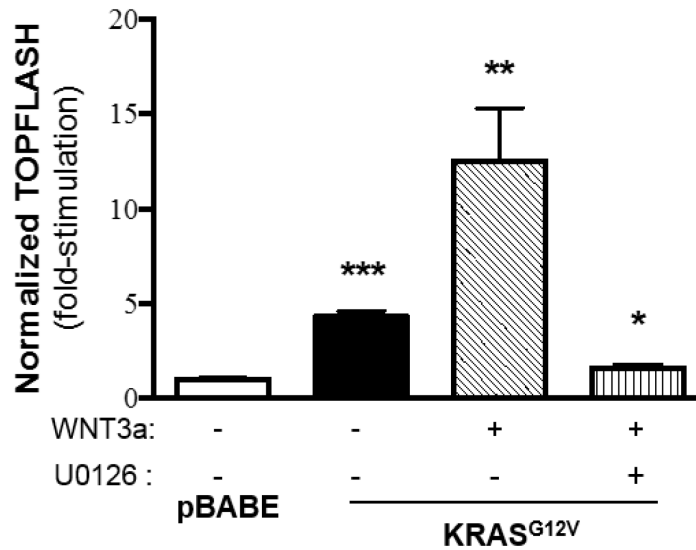
Of further interest, we found increased LRP6 phosphorylation on serine-1490 and threonine-1572 in colorectal tumors. The fact that LRP6 phosphorylation was already deregulated in human adenomas strongly suggests that phosphorylation of this protein may be involved in early stages of colorectal carcinogenesis. Unfortunately, we did not detect any significant association between LRP6 phosphorylation and the presence of mutations in *KRAS* or *BRAF* in the 53 tumors analyzed (n=53). However, a greater number of colorectal tumors needs to be analyzed in order to clearly determine whether there is a link between LRP6 phosphorylation and *KRAS* or *BRAF* mutations. Otherwise, the fact that increased phosphorylation of LRP6 was observed in tumors exhibiting wild-type *KRAS* and *BRAF* suggest that this phosphorylation may be induced by other oncogenic pathways during colorectal carcinogenesis.

In presence of Wnt, LRP6 is phosphorylated within the PPPS/TP motifs by GSK3 β and multiple CK1 members, providing docking sites to bind Axin1 and GSK3, thereby sequestering both proteins away from the β -catenin destruction complex (61,62). However, in our cell models, blockade of MEK reduced LRP6 phosphorylation and decreased β -catenin nuclear localization and transcriptional activity without affecting β -catenin expression. One could speculate that phosphorylation of LRP6 by ERK triggers a signalling cascade controlling β -catenin nuclear localization and activity, independently of Axin or the degradation complex. Such signalling cascade operating in parallel with β -catenin stabilization has recently been documented in other biological systems (63). Indeed, activation of LRP6/Rac1/JNK2 signalling has been suggested to mediate nuclear accumulation of β -catenin independently of its stabilization during canonical Wnt signalling in a bone marrow-derived stromal cell line (63). Preliminary experiments

however indicate that pharmacological inhibition of JNK activity did not alter β -catenin subcellular localization in our cell models (data not shown). Hence, the question of how MEK-dependent phosphorylation of LRP6 controls β -catenin transcriptional activity in CRC cells remains unresolved and will need to be addressed in the future.

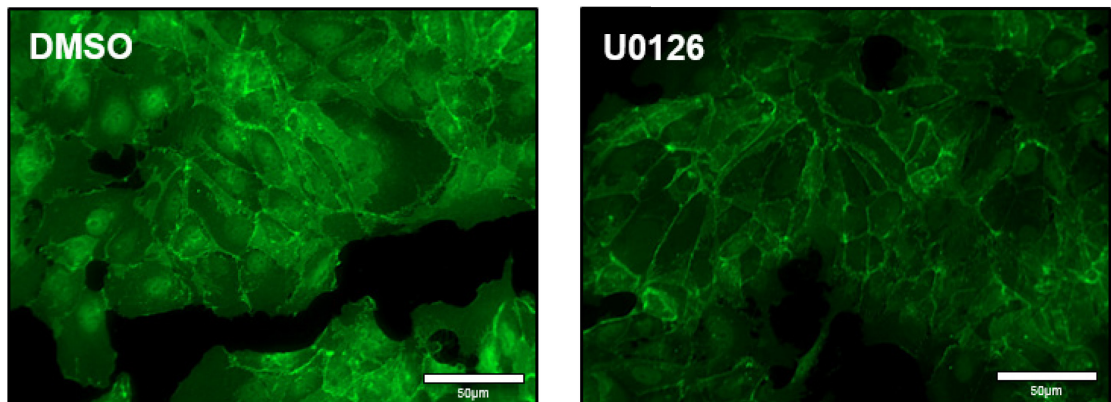
The cellular context of *RAS* mutations in CRC is complex. *KRAS* mutations usually occur early in the course of human disease, not long after *APC* or *β -catenin* mutations (1). The contribution of *RAS* mutations to colon carcinogenesis is therefore uniquely linked to an altered Wnt signalling pathway. Consistent with the multi-hit hypothesis for colon tumor development, previous reports in mice indicate that the addition of *RAS* mutations to *APC* loss causes an increase in adenoma size, number and invasiveness in addition to promoting the expansion of cells bearing putative stem cell markers within the tumors (60, 64-67). Thus, according to the present results, we can speculate that oncogenic KRAS signalling may synergize with *APC* mutations in tumorigenesis by fully enhancing nuclear β -catenin translocation and activity. Interestingly, Phelps et al. (59) observed that homozygous loss of *APC* alone in the intestine was insufficient to cause β -catenin nuclear translocation; rather, the nuclear accumulation of β -catenin, and attendant proliferation, required the additional activation of KRAS and RAF1 oncogenes.

In conclusion, our study demonstrates that the *Wnt/ β -catenin signalling pathway acts as a novel target of MEK/ERK signalling involved in human colorectal tumorigenesis. While further studies are needed to pinpoint the molecular mechanisms by which MEK-dependent LRP6 phosphorylation induces β -catenin/TCF4 activity, the present study provides a novel fundamental insight into how oncogenic KRAS/MAPK signalling controls epithelial oncogenesis in the intestine.*



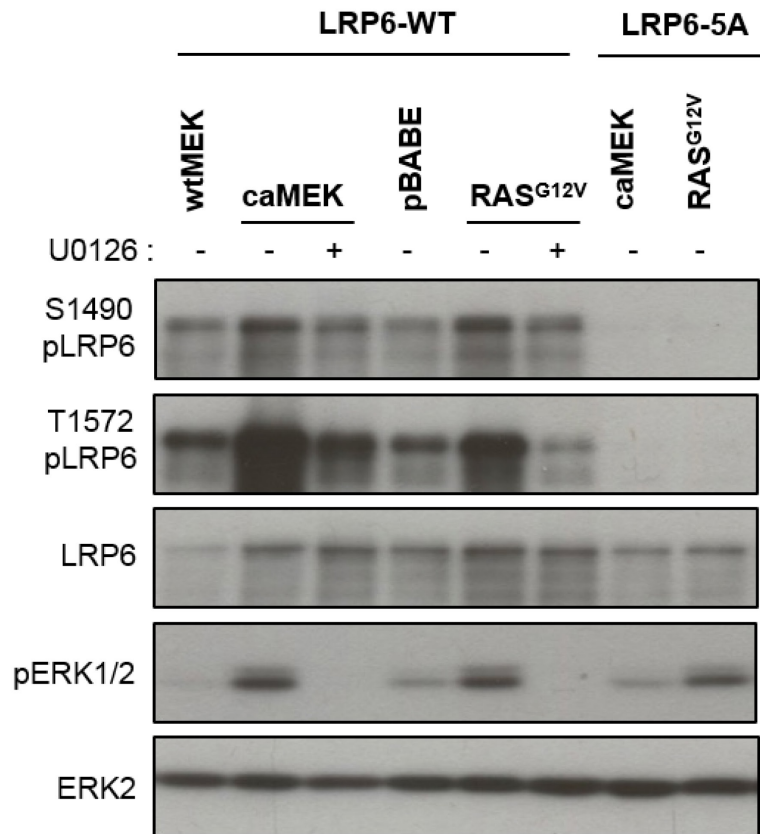
Supplementary Figure S1.

Wnt3a markedly enhances β -catenin transcriptional activity in KRAS-transformed cells. IEC-6 cells expressing pBABE (E.V) or KRAS^{G12V} were transfected with 0.3 μ g of TOPFLASH and FOPFLASH reporter genes. 36 h after transfection, cells were stimulated with 100 ng/ml recombinant human Wnt3a, in presence or absence of 20 μ M U0126, during 3 h before luciferase assay. The increase in luciferase activity was calculated relative to the level observed in pBABE-expressing cells which was set at 1. Values were also normalized with Renilla-luciferase vector. Results are the mean \pm SE of at least 3 separate experiments. Significantly different from control at * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ or *** $p < 0.001$ (Student's t test).



Supplementary Figure S2.

Inhibition of MEK activity in DLD-1 cells attenuates nuclear β -catenin staining. DLD-1 cells were treated during 16 h with 20 μ M U0126. Thereafter, cells were fixed for immunofluorescence and stained for β -catenin. Representative immunofluorescence images are shown.



Supplementary Figure S3.

LRP6 is phosphorylated in a MEK-dependent manner following ectopic expression of oncogenic KRAS or MEK1 in 293T cells. 293T cells were co-transfected with 0.2 µg of plasmids encoding for wtMEK1, caMEK1 or KRAS^{G12V} and 0.2 µg of vectors expressing wild-type LRP6 or LRP6-5A mutant. 16 h after transfection, cells were treated or not with 20 µM U0126 during 24 h and proteins were analyzed by Western blotting with specific antibodies against total and phosphorylated forms of LRP6 (S1490, T1572) as well as total and phosphorylated forms of ERK1/2.

Materials and Methods

Materials

The antibodies against β -catenin, c-myc, anti-HA, Fra-1 and total ERK1/2 were from Santa Cruz Biotechnologies (Santa Cruz, CA, USA). Antibodies recognizing phosphorylated ERK1/2, LRP6 (serine 1490) and β -catenin (serine 552) as well as total LRP6 and TCF4 were obtained from Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA). Antibodies against E-cadherin and β -catenin were from BD Pharmingen (Mississauga, ON, Canada). Antibodies recognizing β -actin, phosphorylated form LRP6 (threonine 1572) and β -catenin (tyrosine 142) were purchased from Millipore (Billerica, MA, USA). Antibodies recognizing phosphorylated β -catenin (tyrosines 86 and 654) were purchased from Abcam (Toronto, ON, Canada). The MEK inhibitor U0126 was purchased from LC Laboratories (Woburn, MA, USA) and ICG-001 was purchased from AbMole BioSciences (Kowloon, Hong Kong). For immunofluorescence, goat anti-rabbit AlexaFluoro488 FITC-labeled or goat anti-mouse AlexaFluoro568-labeled secondary antibodies were from Molecular Probes (Invitrogen, Burlington, ON, Canada). Horseradish peroxidase antibodies were purchased from Amersham Biosciences (Pittsburg, PA, USA), whereas alkaline phosphatase-conjugated antibodies were purchased from Promega (Madison, WI, USA). All other materials were obtained from Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada) unless stated otherwise.

Expression vectors

Expression vectors for HA-tagged wild-type MEK1 (wtMEK) and constitutively activated MEK1 mutant (caMEK), with a conversion of S218 and S222 RAF1-dependent regulatory phosphorylation sites to aspartic residues (Brunet et al., 1999), were provided by Dr J. Pouyssegur (Université de Nice, Nice, France). The HA-wtMEK and HA-caMEK constructs were subcloned into the retroviral expression vector pLXIN (Clontech, Mountain View, CA, USA), as previously described (23). The pRL-SV40 *Renilla* luciferase reporter vector was from Promega (Nepean, ON, Canada). Expression vectors encoding for human Δ NTCF4, human wild-type LRP6, LRP6-5A and KRAS^{G12V} were all provided by Addgene (Cambridge, MA, USA). The T cell factor (TCF) reporter constructs TOPFLASH and its negative control FOPFLASH as well as the c-myc promoter reporter (4xTBE2) and its

control (4xTBE2-mutated) were also purchased from Addgene.

Cell culture

The rat intestinal epithelial crypt cells IEC-6 stably overexpressing wtMEK1 or caMEK1 were cultured as previously described (23,24). E.V (pBABE) and KRAS^{G12V} IEC-6 cells were generated after retroviral infection and were used for <10 passages. Retrovirus preparation and infection were performed as described previously (24). IEC-6 and 293T cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium containing 5% fetal calf serum (FCS), 50 U/ml penicillin and 50 µg/ml streptomycin (Wisent, St-Bruno, QC, Canada). BRAF^{V600E}; ER^{T1} IEC-6 cells were generated and cultured as described (29,68). The colon carcinoma cell line HT29 was obtained from ATCC (HTB-38) and cultured in McCoy's medium (Wisent) containing 10% FCS. The colon adenocarcinoma cell line DLD-1 (CCL-21) was cultured in RPMI medium containing 10% FCS.

Western blot analysis and immunoprecipitations

Cells were washed with ice-cold phosphate-buffered saline and lysed in SDS sample solution (62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 2.5% SDS, 10% glycerol, 5% β-mercaptoethanol, 0.02% bromophenol blue). Western blot analyses were performed as described previously (24). For immunoprecipitations, cells were lysed in a Triton lysis buffer containing 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 40 mM Tris-HCl, pH 7.6, 1% Triton supplemented with protease inhibitors (0.1 mM PMSF, 10 µg/ml leupeptin, 1 µg/ml pepstatin, 10 µg/ml aprotinin). Immunoprecipitations were performed exactly as described previously (69).

Immunofluorescence

Cells grown on sterile glass coverslips were directly fixed in the medium, at room temperature for 15 min, at 3% paraformaldehyde concentration. Immunofluorescence experiments were performed as previously described (24). Pictures were acquired on a Zeiss confocal Laser Scanning Microscope (Carl Zeiss Canada, Toronto, ON, Canada) with a 100×/1.46 oil objective and analyzed using Carl Zeiss software (ZEN). Nuclei were stained with the DNA dye DAPI and negative controls (no primary antibody) were included in all experiments.

Transient transfection and luciferase assays

Transient transfection experiments were performed using the calcium phosphate technique in 293T cells (70) and using Lipofectamine 2000 (Life Technologies, Grand Island, NY, USA) in IEC-6 and CRC cells. For TOPFLASH luciferase assays, cells were transfected with 0.3 µg of TOPFLASH reporter while the FOPFLASH luciferase vector was used as a control for transfection efficiency. For c-myc-luciferase assays, cells were also transfected with 0.3 µg of c-myc promoter reporter (4xTBE2) with the control (4xTBE2-mut) reporter used as a control for transfection efficiency. The pRL-SV40 Renilla luciferase reporter vector (4 ng) was also co-transfected. After specific transfection times, luciferase activity was measured as previously described (69) and according to the Promega protocol.

RNA extraction and Quantitative RT-PCR (qRT-PCR) analyses

Total RNA was isolated using the Totally RNA extraction kit (Invitrogen). RT-PCR analysis was performed using AMV-RT (Roche Diagnostics, Laval, QC, Canada) according to the manufacturer's instructions. *c-myc*, *axin2* and *lef-1* qPCR was performed using a LightCycler apparatus (Roche Diagnostics). Experiments were run and analyzed with LightCycler software 4.0 according to the manufacturer's recommendations using SYBR Green I (QuantiTect SYBR Green PCR Kit) (Qiagen, Toronto, ON, Canada). All samples were run in triplicate. Target expression was quantified relatively to *tbp*, *gapdh* or *pbgd* expression. Polymerase chain reaction analyses were performed as described previously (24). Primers are available upon request.

Cell proliferation assays

All experiments were performed starting with cell populations after 8 days post-selection and subsequently plated for growth assay in 6-well plates at a concentration of 100 000 cells/well. The number of cells was calculated every 2 days for a period of 7 days using a Cell particle counter.

Soft agarose

Concentrated DMEM-2X without phenol red was prepared from powder (Wisent, QC, Canada) according to manufacturer's instructions, except for using half of the

recommended volume of water. The medium was sterilized by 0.22 μm filtration and complemented with 10% FCS. Pre-warmed DMEM-2X was mixed 1:1 with autoclaved 1.4% agarose type VII maintained at 42°C and 6-well dishes were pre-coated with 1 ml/well. Cells were added to the DMEM-agarose mix at 10000 cells/ml and seeded at 2 ml/well. Plates were allowed to solidify under the hood and subsequently placed at 37°C in 5% CO₂ atmosphere. Fresh DMEM without phenol red supplemented with 5% FCS was added on the surface of the agarose every 2-3 days. After 2-3 weeks, colonies were stained by adding 500 μl of DMEM containing 0.5 mg/ml MTT on the surface of the agarose and incubated 2 hours at 37°C and 5% CO₂. Images were acquired using an AlphaImager camera (Alpha Innotech Corporation, Germany) and colonies counted using Image J software.

Migration and invasion assays

Cell migration was assessed using Transwell®-24 well permeable support (8.0- μm pored polycarbonate membranes) (Corning Life Sciences, Tewksbury, MA, USA). Thereafter, 3×10^4 cells in 200 μl of serum-free medium were seeded into the upper chamber and culture medium containing 10% FCS was placed into the lower chamber as chemoattractant agent. Cells were allowed to migrate for the next 36 h in the presence of 2 mM hydroxyurea in both chambers to prevent cell proliferation. Non-migrating cells were removed with two cotton swabs, while migrating cells were fixed for 2 min with methanol and stained with 1% crystal violet for manual counting under the microscope. Invasion assays were conducted using BD Matrigel™ Invasion Chamber 6-well plates (8.0 μm pore-size) according to the manufacturer's instructions (BD Biosciences, Mississauga, ON, Canada). Briefly, plates were thawed at room temperature for 30 min and then Matrigel humidified with DMEM culture medium for at least 1 h at 37°C and 5% CO₂. Thereafter, 2.5×10^5 cells in 200 μl of serum-free medium were seeded into the upper chamber and culture medium containing 10% FCS was placed into the lower chamber as chemoattractant agent. Cells were allowed to migrate for the next 36 h in the presence of 2 mM hydroxyurea in both chambers to prevent cell proliferation (71). Cells were then processed as described above for migration assays.

Animal models

Female nude mice CD1 *nu/nu* mice were purchased from Charles River (Wilmington, MA, USA). All experimental protocols were approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation of the Université de Sherbrooke. *Tumor growth*: A total of 1×10^6 cells suspended in 100 μ l DMEM were injected into the dorsal subcutaneous tissue of 5-week-old female mice CD1 *nu/nu*. Both control and experimental cell lines were *contralaterally* injected into each individual animal. Tumor volume was determined by external measurement according to published methods $(d^2 \times D)/2$ (72). Mice were sacrificed after 28 days post-injection. Tumors were excised and weighed. *Experimental tail vein assays*: The tail vein of 5-week-old female CD1 *nu/nu* mice was injected with 1×10^6 IEC-6 cells suspended in 100 μ l DMEM. Animals were sacrificed at any sign of respiratory distress or weight loss, or after 28 days post-injection. Lungs were maintained in Bouin's fixative for 24 h.

Human tumors

Samples of colorectal tumors (including adenomas) and paired normal tissues (at least 10 cm from the tumor) were obtained from patients undergoing surgical resection. Patients did not receive neoadjuvant therapy. Tissues were obtained after patient's written informed consent, according to the protocol approved by the Institutional Human Subject Review Board of the Centre Hospitalier Universitaire de Sherbrooke. All tissues were frozen in liquid nitrogen within 15 min from resection as recommended by the Canadian Tumor Repository Network (www.ctrnet.ca). For protein extraction, paired tissues were lysed in Triton sample buffer (100mM NaCl, 5mM EDTA [pH 8.0], 50mM Tris-HCl [pH 7.5], 1% Triton X-100, 5% glycerol, 1mM PMSF, 0.2mM orthovanadate, 40mM β -glycerophosphate, 50mM NaF, and 2% protease inhibitor cocktail [P 8340, Sigma-Aldrich]) and immunoblotted as previously described [68]. Genomic DNA was extracted from formalin-fixed paraffin-embedded tissue using a FFPE DNA Isolation Kit for Cells and Tissues (Qiagen). *APC* (exon 15), *KRAS* (exons 1 and 2) and *BRAF* (exon15) were amplified by PCR and the presence of mutations was detected by direct sequencing (Plateforme de Séquençage et de Génotypage des Génomes du CRCHUL, QC, Canada).

Data presentation

Assays were performed in either duplicate or triplicate. Typical results shown are representative of 3 independent experiments. Densitometric analyses were performed by using Image J software. Results were analyzed by the Student's *t* test and were considered statistically significant at $p < 0.05$ or lower.

Competing Interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

EL participated in the design of the study, performed all assays and drafted the manuscript. JCC is the head of the primary CRC bank at U. de Sherbrooke. NR conceived the study, participated in its design and coordination and helped to finalize the writing of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

We thank Guillaume Arguin and Gérald Bernatchez for technical assistance. The biobank of colorectal cancer specimens was supported by a Team grant on digestive epithelium from the Canadian Institutes of Health Research. This research was supported by a grant from the Canadian Institutes of Health Research Grant to Nathalie Rivard (MT-14405). Étienne Lemieux is student scholar from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ). Nathalie Rivard and Julie C Carrier are members of the FRSQ-Funded Centre de Recherche du CHUS. Nathalie Rivard is a recipient of a Canadian Research Chair in colorectal cancer and inflammatory cell signalling.

References

- (1) Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990;61: 759-767.
- (2) Gregorieff A, Clevers H. Wnt signaling in the intestinal epithelium: from endoderm to cancer. *Genes Dev* 2005;19: 877-890.
- (3) Taketo MM. Mouse models of gastrointestinal tumors. *Cancer Sci* 2006;97: 355-361.
- (4) Ashton GH, Morton JP, Myant K, Phesse TJ, Ridgway RA, Marsh V, et al. Focal adhesion kinase is required for intestinal regeneration and tumorigenesis downstream of Wnt/c-Myc signaling. *Dev Cell* 2010;19: 259-269.
- (5) Sansom OJ, Meniel VS, Muncan V, Phesse TJ, Wilkins JA, Reed KR, et al. Myc deletion rescues Apc deficiency in the small intestine. *Nature* 2007;446: 676-679.
- (6) Worthley DL, Leggett BA. Colorectal cancer: molecular features and clinical opportunities. *Clin Biochem Rev* 2010;31: 31-38.
- (7) Pretlow TP, Pretlow TG. Mutant KRAS in aberrant crypt foci (ACF): initiation of colorectal cancer? *Biochim Biophys Acta* 2005;1756: 83-96.
- (8) Smakman N, Borel Rinkes IH, Voest EE, Kranenburg O. Control of colorectal metastasis formation by K-Ras. *Biochim Biophys Acta* 2005;1756: 103-114.
- (9) Saucier C, Rivard N. Epithelial Cell Signalling in Colorectal Cancer Metastasis. In: Beauchemin N, Huot J, editors. : Springer Netherlands; 2010. p. 205-241.
- (10) Dasari A, Messersmith WA. New strategies in colorectal cancer: biomarkers of response to epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies and potential therapeutic targets in phosphoinositide 3-kinase and mitogen-activated protein kinase pathways. *Clin Cancer Res* 2010;16: 3811-3818.
- (11) Dienstmann R, Taberero J. BRAF as a target for cancer therapy. *Anticancer Agents Med Chem* 2011;11: 285-295.
- (12) Ikenoue T, Kanai F, Hikiba Y, Obata T, Tanaka Y, Imamura J, et al. Functional analysis of PIK3CA gene mutations in human colorectal cancer. *Cancer Res* 2005;65: 4562-4567.
- (13) Deng G, Bell I, Crawley S, Gum J, Terdiman JP, Allen BA, et al. BRAF mutation is frequently present in sporadic colorectal cancer with methylated hMLH1, but not in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2004;10: 191-195.
- (14) Li WQ, Kawakami K, Ruzkiewicz A, Bennett G, Moore J, Iacopetta B. BRAF mutations are associated with distinctive clinical, pathological and molecular features of colorectal cancer independently of microsatellite instability status. *Mol Cancer* 2006;5: 2.
- (15) Yuen ST, Davies H, Chan TL, Ho JW, Bignell GR, Cox C, et al. Similarity of the phenotypic patterns associated with BRAF and KRAS mutations in colorectal neoplasia. *Cancer Res* 2002;62: 6451-6455.

- (16) Rajagopalan H, Bardelli A, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B, Velculescu VE. Tumorigenesis: RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status. *Nature* 2002;418: 934.
- (17) Ramos JW. The regulation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) in mammalian cells. *Int J Biochem Cell Biol* 2008;40: 2707-2719.
- (18) Aliaga JC, Deschenes C, Beaulieu JF, Calvo EL, Rivard N. Requirement of the MAP kinase cascade for cell cycle progression and differentiation of human intestinal cells. *Am J Physiol* 1999;277: G631-41.
- (19) Rivard N, Boucher MJ, Asselin C, L'Allemain G. MAP kinase cascade is required for p27 downregulation and S phase entry in fibroblasts and epithelial cells. *Am J Physiol* 1999;277: C652-64.
- (20) Fang JY, Richardson BC. The MAPK signalling pathways and colorectal cancer. *Lancet Oncol* 2005;6: 322-327.
- (21) Eggstein S, Franke M, Kutschka I, Manthey G, von Specht BU, Ruf G, et al. Expression and activity of mitogen activated protein kinases in human colorectal carcinoma. *Gut* 1999;44: 834-838.
- (22) Lee SH, Lee JW, Soung YH, Kim SY, Nam SW, Park WS, et al. Colorectal tumors frequently express phosphorylated mitogen-activated protein kinase. *APMIS* 2004;112: 233-238.
- (23) Boucher MJ, Jean D, Vezina A, Rivard N. Dual role of MEK/ERK signaling in senescence and transformation of intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004;286: G736-46.
- (24) Lemieux E, Bergeron S, Durand V, Asselin C, Saucier C, Rivard N. Constitutively active MEK1 is sufficient to induce epithelial-to-mesenchymal transition in intestinal epithelial cells and to promote tumor invasion and metastasis. *Int J Cancer* 2009;125: 1575-1586.
- (25) Komatsu K, Buchanan FG, Katkuri S, Morrow JD, Inoue H, Otaka M, et al. Oncogenic potential of MEK1 in rat intestinal epithelial cells is mediated via cyclooxygenase-2. *Gastroenterology* 2005;129: 577-590.
- (26) Voisin L, Julien C, Duhamel S, Gopalbhai K, Claveau I, Saba-EI-Leil MK, et al. Activation of MEK1 or MEK2 isoform is sufficient to fully transform intestinal epithelial cells and induce the formation of metastatic tumors. *BMC Cancer* 2008;8: 337-2407-8-337.
- (27) Sebolt-Leopold JS, Dudley DT, Herrera R, Van Becelaere K, Wiland A, Gowan RC, et al. Blockade of the MAP kinase pathway suppresses growth of colon tumors in vivo. *Nat Med* 1999;5: 810-816.
- (28) Ikenoue T, Hikiba Y, Kanai F, Aragaki J, Tanaka Y, Imamura J, et al. Different effects of point mutations within the B-Raf glycine-rich loop in colorectal tumors on mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase/extracellular signal-regulated

kinase and nuclear factor kappaB pathway and cellular transformation. *Cancer Res* 2004;64: 3428-3435.

(29) Cagnol S, Rivard N. Oncogenic KRAS and BRAF activation of the MEK/ERK signaling pathway promotes expression of dual-specificity phosphatase 4 (DUSP4/MKP2) resulting in nuclear ERK1/2 inhibition. *Oncogene* 2013;32: 564-576.

(30) Nandan MO, McConnell BB, Ghaleb AM, Bialkowska AB, Sheng H, Shao J, et al. Kruppel-like factor 5 mediates cellular transformation during oncogenic KRAS-induced intestinal tumorigenesis. *Gastroenterology* 2008;134: 120-130.

(31) Tian X, Liu Z, Niu B, Zhang J, Tan TK, Lee SR, et al. E-cadherin/beta-catenin complex and the epithelial barrier. *J Biomed Biotechnol* 2011;2011: 567305.

(32) Yochum GS, Cleland R, Goodman RH. A genome-wide screen for beta-catenin binding sites identifies a downstream enhancer element that controls c-Myc gene expression. *Mol Cell Biol* 2008;28: 7368-7379.

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

(34) Naishiro Y, Yamada T, Takaoka AS, Hayashi R, Hasegawa F, Imai K, et al. Restoration of epithelial cell polarity in a colorectal cancer cell line by suppression of beta-catenin/T-cell factor 4-mediated gene transactivation. *Cancer Res* 2001;61: 2751-2758.

(35) van de Wetering M, Sancho E, Verweij C, de Lau W, Oving I, Hurlstone A, et al. The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. *Cell* 2002;111: 241-250.

(36) Emami KH, Nguyen C, Ma H, Kim DH, Jeong KW, Eguchi M, et al. A small molecule inhibitor of beta-catenin/CREB-binding protein transcription [corrected]. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101: 12682-12687.

(37) Rowan AJ, Lamlum H, Ilyas M, Wheeler J, Straub J, Papadopoulou A, et al. APC mutations in sporadic colorectal tumors: A mutational "hotspot" and interdependence of the "two hits". *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97: 3352-3357.

(38) Yang J, Zhang W, Evans PM, Chen X, He X, Liu C. Adenomatous polyposis coli (APC) differentially regulates beta-catenin phosphorylation and ubiquitination in colon cancer cells. *J Biol Chem* 2006;281: 17751-17757.

(39) Hart M, Concordet JP, Lassot I, Albert I, del los Santos R, Durand H, et al. The F-box protein beta-TrCP associates with phosphorylated beta-catenin and regulates its activity in the cell. *Curr Biol* 1999;9: 207-210.

(40) Piedra J, Miravet S, Castano J, Palmer HG, Heisterkamp N, Garcia de Herreros A, et al. p120 Catenin-associated Fer and Fyn tyrosine kinases regulate beta-catenin Tyr-142 phosphorylation and beta-catenin-alpha-catenin Interaction. *Mol Cell Biol* 2003;23: 2287-2297.

- (41) Brembeck FH, Schwarz-Romond T, Bakkers J, Wilhelm S, Hammerschmidt M, Birchmeier W. Essential role of BCL9-2 in the switch between beta-catenin's adhesive and transcriptional functions. *Genes Dev* 2004;18: 2225-2230.
- (42) Roura S, Miravet S, Piedra J, Garcia de Herreros A, Dunach M. Regulation of E-cadherin/Catenin association by tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* 1999;274: 36734-36740.
- (43) Taurin S, Sandbo N, Qin Y, Browning D, Dulin NO. Phosphorylation of beta-catenin by cyclic AMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 2006;281: 9971-9976.
- (44) Fang D, Hawke D, Zheng Y, Xia Y, Meisenhelder J, Nika H, et al. Phosphorylation of beta-catenin by AKT promotes beta-catenin transcriptional activity. *J Biol Chem* 2007;282: 11221-11229.
- (45) He XC, Yin T, Grindley JC, Tian Q, Sato T, Tao WA, et al. PTEN-deficient intestinal stem cells initiate intestinal polyposis. *Nat Genet* 2007;39: 189-198.
- (46) Krejci P, Aklian A, Kaucka M, Sevcikova E, Prochazkova J, Masek JK, et al. Receptor tyrosine kinases activate canonical WNT/beta-catenin signaling via MAP kinase/LRP6 pathway and direct beta-catenin phosphorylation. *PLoS One* 2012;7: e35826.
- (47) Fernandez-Medarde A, Santos E. Ras in cancer and developmental diseases. *Genes Cancer* 2011;2: 344-358.
- (48) Malumbres M, Barbacid M. RAS oncogenes: the first 30 years. *Nat Rev Cancer* 2003;3: 459-465.
- (49) Niault TS, Baccarini M. Targets of Raf in tumorigenesis. *Carcinogenesis* 2010;31: 1165-1174.
- (50) Tang J, Qi X, Mercola D, Han J, Chen G. Essential role of p38gamma in K-Ras transformation independent of phosphorylation. *J Biol Chem* 2005;280: 23910-23917.
- (51) Daugherty RL, Gottardi CJ. Phospho-regulation of Beta-catenin adhesion and signaling functions. *Physiology (Bethesda)* 2007;22: 303-309.
- (52) Bienz M. beta-Catenin: a pivot between cell adhesion and Wnt signalling. *Curr Biol* 2005;15: R64-7.
- (53) Gumbiner BM. Regulation of cadherin adhesive activity. *J Cell Biol* 2000;148: 399-404.
- (54) Harris TJ, Peifer M. Decisions, decisions: beta-catenin chooses between adhesion and transcription. *Trends Cell Biol* 2005;15: 234-237.
- (55) Nelson WJ, Nusse R. Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. *Science* 2004;303: 1483-1487.
- (56) Perez-Moreno M, Fuchs E. Catenins: keeping cells from getting their signals crossed. *Dev Cell* 2006;11: 601-612.

- (57) Singh A, Sweeney MF, Yu M, Burger A, Greninger P, Benes C, et al. TAK1 inhibition promotes apoptosis in KRAS-dependent colon cancers. *Cell* 2012;148: 639-650.
- (58) Horst D, Chen J, Morikawa T, Ogino S, Kirchner T, Shivdasani RA. Differential WNT activity in colorectal cancer confers limited tumorigenic potential and is regulated by MAPK signaling. *Cancer Res* 2012;72: 1547-1556.
- (59) Phelps RA, Chidester S, Dehghanizadeh S, Phelps J, Sandoval IT, Rai K, et al. A two-step model for colon adenoma initiation and progression caused by APC loss. *Cell* 2009;137: 623-634.
- (60) Wang C, Zhao R, Huang P, Yang F, Quan Z, Xu N, et al. APC loss-induced intestinal tumorigenesis in *Drosophila*: Roles of Ras in Wnt signaling activation and tumor progression. *Dev Biol* 2013;378: 122-140.
- (61) Tamai K, Zeng X, Liu C, Zhang X, Harada Y, Chang Z, et al. A mechanism for Wnt coreceptor activation. *Mol Cell* 2004;13: 149-156.
- (62) Wolf J, Palmby TR, Gavard J, Williams BO, Gutkind JS. Multiple PPPS/TP motifs act in a combinatorial fashion to transduce Wnt signaling through LRP6. *FEBS Lett* 2008;582: 255-261.
- (63) Wu X, Tu X, Joeng KS, Hilton MJ, Williams DA, Long F. Rac1 activation controls nuclear localization of beta-catenin during canonical Wnt signaling. *Cell* 2008;133: 340-353.
- (64) Janssen KP, Alberici P, Fsihi H, Gaspar C, Breukel C, Franken P, et al. APC and oncogenic KRAS are synergistic in enhancing Wnt signaling in intestinal tumor formation and progression. *Gastroenterology* 2006;131: 1096-1109.
- (65) Luo F, Brooks DG, Ye H, Hamoudi R, Poulogiannis G, Patek CE, et al. Mutated K-ras(Asp12) promotes tumorigenesis in Apc(Min) mice more in the large than the small intestines, with synergistic effects between K-ras and Wnt pathways. *Int J Exp Pathol* 2009;90: 558-574.
- (66) Sansom OJ, Meniel VS, Muncan V, Pheesse TJ, Wilkins JA, Reed KR, et al. Myc deletion rescues Apc deficiency in the small intestine. *Nature* 2007;446: 676-679.
- (67) Haigis KM, Kendall KR, Wang Y, Cheung A, Haigis MC, Glickman JN, et al. Differential effects of oncogenic K-Ras and N-Ras on proliferation, differentiation and tumor progression in the colon. *Nat Genet* 2008;40: 600-608.
- (68) Bergeron S, Lemieux E, Durand V, Cagnol S, Carrier JC, Lussier JG, et al. The serine protease inhibitor serpinE2 is a novel target of ERK signaling involved in human colorectal tumorigenesis. *Mol Cancer* 2010;9: 271-4598-9-271.
- (69) Simoneau M, Coulombe G, Vandal G, Vezina A, Rivard N. SHP-1 inhibits beta-catenin function by inducing its degradation and interfering with its association with TATA-binding protein. *Cell Signal* 2011;23: 269-279.

(70) Cagnol S, Van Obberghen-Schilling E, Chambard JC. Prolonged activation of ERK1,2 induces FADD-independent caspase 8 activation and cell death. *Apoptosis* 2006;11: 337-346.

(71) Calzado MA, MacHo A, Lucena C, Munoz E. Hydroxyurea inhibits the transactivation of the HIV-long-terminal repeat (LTR) promoter. *Clin Exp Immunol* 2000;120: 317-323.

(72) Wang J, Sun L, Myeroff L, Wang X, Gentry LE, Yang J, et al. Demonstration that mutation of the type II transforming growth factor beta receptor inactivates its tumor suppressor activity in replication error-positive colon carcinoma cells. *J Biol Chem* 1995;270: 22044-22049.

DISCUSSION

1 Rôle du sentier MAP kinase dans le contrôle du statut prolifération-différenciation de l'épithélium intestinal.

La fine régulation spatio-temporelle des processus de prolifération et différenciation est nécessaire au maintien de l'intégrité morphologique et fonctionnelle de l'épithélium intestinal. Plusieurs études ont mis en valeur le rôle positif de l'activité ERK1/2 dans le contrôle de la prolifération des cellules épithéliales intestinales. Dans les cellules cryptales intestinales normales humaines ou de rat, l'activation soutenue de ERK1/2 est nécessaire à l'entrée en phase S induite par le sérum, les facteurs de croissance (EGF) ainsi que des hormones mitogéniques telles que la vasopressine et l'angiotensine II (Kaiser et al., 1999; Aliaga et al., 1999; Rivard 1999, Paquin 2013; Chiu et al., 2002; 2003). Plus spécifiquement, l'activation de la signalisation MEK/ERK a été montrée essentielle à la translocation nucléaire de E2F4, un facteur de transcription nécessaire à l'expression de gènes impliqués dans la réplication de l'ADN (Deschênes et al. 2004; Garneau et al., 2009; Paquin et al., 2013). Cependant, le rôle et la régulation de la signalisation ERK/MAP kinase dans les CEIs déterminées à se différencier et en différenciation restaient à élucider.

Avant le début de mes travaux de recherche, certaines évidences suggéraient déjà que l'activité des ERK1/2 jouait un rôle négatif dans la différenciation entérocytaire et que l'inhibition de ces kinases pourrait être requise pour atteindre un état pleinement différencié. Ces évidences provenaient de résultats obtenus dans deux lignées cellulaires capables de se différencier en culture: les Caco-2/15 et les HT29 (Augeron et Labois, 1984, Grasset et al., 1985, Wice et al., 1985). Dans ces deux modèles, lors du processus de différenciation les cellules cessent de proliférer, se polarisent et expriment des marqueurs de différenciation entérocytaire. Plus spécifiquement, notre groupe a observé une très forte baisse de l'activité ERK1/2 lors de la différenciation des cellules Caco-2/15 (Aliaga et al., 1999). De plus, le traitement des cellules HT29 et Caco-2/15 au butyrate, un inducteur de différenciation entérocytaire, induit également l'inhibition de l'activité des kinases ERK1/2 (Ding et al., 2001). De même, Taupin et Podolsky ont également rapporté la diminution de l'activité des ERK1/2 durant la différenciation des cellules HT29-18-N2, un clone de HT29

qui se différencie spontanément suite au retrait du glucose du milieu de culture. Finalement, notre groupe a rapporté que les formes actives et phosphorylées des ERK1/2 sont principalement retrouvées au noyau des cellules indifférenciées et prolifératives de la crypte intestinale humaine, alors que les formes phosphorylées sont beaucoup plus faibles dans les cellules différenciées de la villosité. Ces résultats suggèrent qu'une fine régulation de l'activité ERK1/2 existe le long de l'axe crypte-villosité (Aliaga et al., 1999) ainsi que durant la différenciation des entérocytes en culture. Le rôle exact et la nécessité de cette inactivation dans l'arrêt de prolifération et dans l'induction de la différenciation des cellules épithéliales intestinales restaient donc à déterminer. Nous avons donc émis l'hypothèse que l'inhibition de l'activité MEK/ERK devait être nécessaire au processus de différenciation entérocytaire et que le maintien d'une forte activité allait, au contraire, conserver les cellules dans un état prolifératif et indifférencié.

1.1 L'hyperactivation de la signalisation MEK/ERK bloque la différenciation morphologique ainsi que l'expression des marqueurs de différenciation spécifiques à l'épithélium intestinal.

Dans le but de valider notre hypothèse, nous avons surexprimé la forme active de MEK1 dans le modèle Caco-2/15 (Manuscrit 1). Deux populations ont été générées exprimant de façon stable la forme sauvage de MEK1 (wtMEK1) ou la forme constitutive active de MEK1 (caMEK1; *SS/DD 218/222*), dans le but de maintenir une activité ERK1/2 élevée après l'atteinte de la confluence cellulaire. Malheureusement, l'expression du mutant caMEK1 n'a pas été suffisante pour prévenir l'inhibition de l'activité ERK1/2 à post-confluence et par conséquent, n'a pas eu d'impact sur l'expression des marqueurs de différenciation entérocytaire tels que la sucrase-isomaltase (SI). Cette observation nous a suggéré que la diminution de l'activité ERK1/2 devait dépendre principalement de l'expression des phosphatases capables de déphosphoryler directement ERK1/2. Notre équipe a déjà rapporté une forte induction des phosphatases DUSP1 et DUSP6 durant la différenciation des cellules Caco-2/15 (Aliaga et al., 1999), ce qui en fait de bons candidats potentiellement impliqués dans l'inactivation des ERKs. De plus, au niveau de l'axe crypte-villosité, l'expression de DUSP1 est rapportée pour être restreinte aux entérocytes différenciés de la villosité, là où l'on retrouve justement le plus faible niveau d'activité

ERK1/2 (Carrasco et Bravo, 1993; Mamajiwalla et Burgess, 1995). Nous avons envisagé de générer des shRNA dirigés contre DUSP1 et DUSP6 pour évaluer leur contribution dans l'inhibition de l'activité ERK1/2 ainsi que sur la différenciation des Caco-2/15. Cependant, nous avons abandonné cette stratégie étant donné les phénomènes de compensation connus entre les DUSPs lorsque l'expression de l'une d'entre elles est inhibée (Huang et Tan., 2012). En effet, les DUSPs font partie d'une large famille de phosphatases qui possèdent une grande redondance au niveau de leur capacité à déphosphoryler les ERKs. Il est donc fort probable que l'abolition de plus d'une DUSPs soit nécessaire pour maintenir l'activité ERK1/2 élevée durant le processus de différenciation.

Pour pallier à cette situation, un modèle plus simple de différenciation entérocytaire a été utilisé, soit les cellules IEC-6 exprimant de façon stable le facteur de transcription Cdx3, l'homologue du hamster de Cdx2 (German et al., 1992). La surexpression de Cdx3, à elle seule, est capable d'induire un certain niveau de différenciation de type entérocytaire. La lignée intestinale d'origine cryptale IEC-6 n'exprime pas Cdx2/3 de façon endogène, son expression ectopique induit l'apparition d'un phénotype de cellules entérocytaires matures associée à la formation de structures multicellulaires, à l'établissement d'une polarité épithéliale, à l'apparition de microvillosités à la surface apicale ainsi qu'à l'expression de gènes spécifiques à l'intestin, notamment la *sucrase-isomaltase* (Suh et Trabber, 1996), la *lactase* (Fang et al., 2000).

De manière intéressante, nous avons observé dans les IEC-6/Cdx3 une diminution de l'activité ERK1/2 durant le processus de différenciation cellulaire observé suite à l'atteinte de la confluence. Cette situation est donc analogue à ce qu'on peut observer dans les autres modèles de différenciation entérocytaire (Caco-2, HT-29) (Aliaga et al., 1999; Taupin et Podolsky, 1999; Ding et al., 2001). L'expression de la forme constitutive active de MEK1, dans les IEC-6/Cdx3, a prévenu cette inhibition de l'activité ERK1/2 et a permis de maintenir un niveau d'activité élevé durant le processus de différenciation et ce, jusqu'à 30 jours de post-confluence. De façon concomitante, nous avons observé une forte diminution de la différenciation morphologique des cellules exprimant le caMEK1 marquée par une altération de l'architecture multicellulaire, une diminution des microvillosités à la surface

apicale des cellules ainsi qu'une désorganisation des jonctions cellulaires. L'altération de la morphologie entérocytaire est accompagnée d'une réduction importante de l'expression de marqueurs de différenciation induits par l'expression de Cdx3, notamment la SI, FABP, MUC2 ainsi que la phosphatase alcaline. Nos résultats rappellent ceux antérieurement obtenus par Celano et collaborateurs qui ont démontré que l'expression de la forme oncogénique de HRAS (HRAS^{V12}) dans les cellules Caco-2, réprimait l'expression des marqueurs de différenciation entérocytaire comme la SI et la villine (Celano et al., 1993). À l'inverse, dans le modèle cellulaire HT-29, l'inhibition prolongée de l'activité endogène de MEK1/2 a précédemment été démontrée comme étant capable d'induire l'expression de la SI, TFF, et MUC2, des gènes spécifiques aux CEIs (Taupin et Podolsky, 1999). Dans la même logique, nous avons démontré que l'activité ERK1/2 endogène, élevée dans les Caco-2/15 prolifératives et sous-confluentes, exerce un effet inhibiteur sur la différenciation entérocytaire. En effet, l'inhibition de l'activité MEK endogène, par l'utilisation du PD98059, augmente de façon significative l'expression du gène de la SI telle que mesurée par l'expression des transcrits de même que par l'utilisation d'un gène rapporteur luciférase. Inversement, l'augmentation de l'activité MEK/ERK, par l'expression transitoire du mutant caMEK1, réduit de façon dose-dépendante l'activité du promoteur du gène de la SI de même que celui de la lactase (résultats non présentés). Dans l'ensemble, ces résultats démontrent qu'une forte activité MEK/ERK bloque plusieurs aspects du processus de différenciation entérocytaire, notamment en bloquant l'induction des marqueurs de différenciation spécifiques à l'intestin et en altérant la différenciation morphologique induite par l'expression de Cdx3.

1.2 Mécanisme de répression de la différenciation entérocytaire médiée par l'activité MEK.

Même si plusieurs évidences supportent un rôle inhibiteur de l'activité MEK/ERK dans l'induction de la différenciation entérocytaire, peu d'études se sont attardées à identifier les mécanismes moléculaires qui y sont impliqués. De manière intéressante, nous avons observé que dans les cellules IEC-6, l'expression du caMEK1 réduit l'effet inducteur de Cdx3 sur l'expression d'un de ses partenaires transcriptionnels aussi impliqué dans la différenciation épithéliale intestinale. En effet, nous avons observé une forte réduction des

transcrits de HNF-1 α , alors que l'expression d'HNF4 α n'est pas affectée. Ces deux facteurs de transcription sont connus pour être fortement impliqués dans la différenciation terminale des cellules épithéliales intestinales (Richmond et Breault, 2013; Babeu et al., 2009). Chez la souris, la perte d'HNF1 α s'accompagne d'un défaut dans la différenciation des cellules de la lignée sécrétrice associé à une augmentation de la prolifération des cellules cryptales et au développement d'une intestinalomégalie au cours de la vie adulte (Lussier et al., 2010). Récemment, il a été démontré que le maintien de l'expression d'HNF1 α et d'HNF4 α dans l'intestin embryonnaire est contrôlé par Cdx2 (Gao et al., 2009). Le mécanisme moléculaire derrière cette régulation différentielle d'HNF1 α et d'HNF4 α par caMEK1, reste néanmoins encore à clarifier. Concernant le maintien de l'expression de HNF4 α , on peut spéculer que d'autres facteurs pourraient être impliqués et ce, même en présence du caMEK1. Des expériences complémentaires seront nécessaires pour mieux comprendre la régulation différentielle de ces facteurs de transcription dans un contexte d'activation oncogénique du sentier MEK/ERK.

En plus de montrer l'importance de l'inhibition de l'activité MEK/ERK dans le processus de différenciation entérocytaire, notre étude met également en évidence un mécanisme par lequel l'hyperactivation de MEK1 réprime la fonction de Cdx2/3. La phosphorylation de ce facteur de transcription a maintes fois été impliquée dans la régulation de son activité ou de sa stabilité (Boulanger et al., 2005; Houdes et al., 2001; Rings et al., 2001; Gross et al., 2005). L'utilisation d'un anticorps dirigé contre la forme phosphorylée sur la sérine-60 de Cdx2/3 nous a démontré que cette dernière est fortement augmentée dans les IEC-6/Cdx3 exprimant le mutant caMEK1. Précédemment, cette phosphorylation a été rapportée pour diminuer la capacité de transactivation de Cdx2 (Rings et al., 2001). Pour mieux évaluer son impact dans notre modèle à l'étude, nous avons généré une forme mutante de Cdx3 où la sérine en position 60 a été substituée par un résidu alanine, bloquant ainsi la phosphorylation sur ce site. L'utilisation de gènes rapporteurs a permis de montrer qu'effectivement l'activité MEK réduisait le potentiel de transactivation de Cdx3 en induisant sa phosphorylation sur sérine-60. Des essais de retard sur gel (EMSA) ont démontré que cette réduction ne provenait pas d'une modulation de la capacité de liaison de Cdx3 au promoteur du gène de la *SI*. De même, la stabilité de Cdx3 ne semble pas être

affectée par cette phosphorylation alors que sa capacité de transactivation est réduite. Des travaux supplémentaires seront nécessaires pour mieux caractériser l'impact de cette phosphorylation sur le recrutement de partenaires transcriptionnels (HNF1 α , GATA-4 ou CBP/p300 par exemple). Fait intéressant à noter, au niveau de l'axe crypte-villosité, la forme phosphorylée de Cdx2 sur sérine-60 est principalement retrouvée au niveau de la crypte, soit le compartiment prolifératif (Rings et al., 2001), là même où l'on retrouve les formes phosphorylées et actives des ERK1/2 (Aliaga et al., 1999). De manière similaire, on retrouve majoritairement cette phosphorylation dans les cellules Caco-2/15 sous-confluentes et prolifératives, puis elle diminue durant le processus de différenciation parallèlement à la réduction de l'activité ERK1/2. Ces résultats suggèrent que la régulation de la phosphorylation de Cdx2/3 par l'activité MEK/ERK serait probablement impliquée dans le contrôle des mécanismes de prolifération et différenciation de l'épithélium intestinal.

L'impact de l'activité MEK/ERK sur l'établissement des complexes de jonctions qui régissent la morphologie épithéliale doit également contribuer à l'effet inhibiteur de la voie MAP kinase sur le processus de différenciation. Dans mon étude sur l'implication de l'activité MEK dans la transformation des cellules IEC-6, j'ai démontré que la forme active de MEK1 induisait l'expression de Snail1 et Snail2 (Lemieux et al., 2009), deux facteurs de transcription capables de réprimer la polarité apico-basale des cellules épithéliales (Bates et Mercurio, 2005; Lee et al., 2006). Conséquemment, les cellules IEC-6/Cdx3 exprimant le caMEK1 sont moins polarisées et expriment des niveaux réduits des protéines de jonctions E-cadhérine et ZO-1. Des études réalisées dans notre laboratoire avaient démontré que la signalisation découlant des jonctions adhérentes fonctionnelles favorisait la différenciation entérocytaire. En effet, l'engagement de la E-cadhérine au sein des complexes de jonctions permet le recrutement et l'activation de la PI3K via la protéine d'échafaudage hDlg, ce qui promeut l'assemblage des jonctions adhérentes fonctionnelles (Laprise et al., 2004). L'engagement de la E-cadhérine serait par la suite responsable de l'activation de la MAP kinase p38 α (Houde et al., 2001) qui transloque alors au noyau et phosphoryle Cdx2. Cette phosphorylation augmente sa capacité de transactivation et par conséquent l'expression de marqueurs de différenciation entérocytaire ainsi que la différenciation morphologique

(Houde et al., 2001; Laprise et al., 2002). Dans notre modèle, l'expression du mutant hyperactif de MEK1 induit l'expression des répresseurs transcriptionnels Snail1 et Snail2, ce qui inhibe l'expression de la E-cadhérine et fort probablement, déstabilise les jonctions adhérentes. Ainsi, l'activité MEK/ERK agit sur plusieurs niveaux pour réduire la capacité de transactivation de Cdx2, soit indirectement en déstabilisant les jonctions ou directement en induisant la phosphorylation inhibitrice sur la sérine-60. Ainsi, une forte activation de la signalisation MEK/ERK semble maintenir les cellules épithéliales dans un phénotype de cellules cryptales indifférenciées en inhibant l'activité de Cdx2/3 et en inhibant la différenciation morphologique associée à l'établissement d'une polarité cellulaire.

2 Rôle de la voie KRAS/ERK MAP kinase dans la carcinogénèse colorectale.

Le passage d'un épithélium normal à un épithélium dysplasique de même que sa progression vers le stade de carcinome est marqué par l'accumulation séquentielle d'altérations génétiques d'oncogènes et de suppresseurs de tumeurs. La mutation activatrice de l'oncogène KRAS est l'un des événements les plus fréquents du cancer du côlon et sa découverte fût l'une des avancées majeures dans l'analyse génétique du cancer colorectal (Forrester et al., 1987). Des mutations de type gain de fonction de KRAS et de son effecteur BRAF sont retrouvées dans plus de 50% des tumeurs humaines d'origine colorectale (Schubbert et al., 2007). Ces mutations induisent une activation aberrante de la signalisation MEK/ERK que l'on soupçonne nécessaire au développement de lésions cancéreuses (O'Hagan et Heyer, 2011). Chez la souris, l'expression des formes oncogéniques de KRAS et BRAF est associée à l'induction d'une hyperplasie de l'épithélium intestinale, marquée par l'apparition d'adénomes colorectaux (Haigis et al., 2008; Carragher et al., 2010). Dans ces modèles, l'utilisation d'un inhibiteur spécifique de MEK1/2 (CI-1040) bloque l'hyperplasie, supportant le rôle de l'activation aberrante de la signalisation MEK/ERK dans la tumorigénèse colorectale induite par les formes oncogéniques de KRAS et BRAF.

Dans le but de déterminer la contribution spécifique de ce sentier de signalisation, une forme constitutivement active de MEK1 (*SS/DD_218/222*) ou caMEK1 a été exprimée dans

le modèle cellulaire IEC-6, des cellules épithéliales intestinales normales et immortalisées. Les résultats obtenus par notre groupe de recherche (Boucher et al., 2004) et autres (Komatsu et al., 2005; Voisin et al., 2008) ont démontré que l'expression de cette forme mutante de MEK1 était suffisante à induire leur transformation en culture. Plus spécifiquement, notre groupe a montré que l'activation constitutive du sentier MEK/ERK, dans les cellules IEC-6, stimule la prolifération à post-confluence, induit la formation de foyers cellulaires de même que la capacité à croître en indépendance d'ancrage à la matrice (Boucher et al., 2004). Mes travaux ainsi que ceux d'autres groupes ont démontré que l'hyperactivation de MEK1 ou de MEK2 confère aux cellules IEC-6 la capacité à former des tumeurs bien vascularisées chez la souris immunodéficiente (Voisin et al., 2008; Komatsu et al., 2005; Lemieux et al., 2009). Dans l'ensemble, ces observations supportent fortement la notion que l'activité MEK/ERK joue un rôle crucial dans l'induction de la transformation cellulaire ainsi que de la tumorigénèse des cellules épithéliales intestinales normales. Néanmoins, les mécanismes moléculaires par lesquels la signalisation MEK/ERK contrôle ces processus tumorigéniques restaient encore à définir.

2.1 Régulation de Cdx2 par la signalisation MEK/ERK, implication potentielle dans la tumorigénèse colorectale.

Plusieurs études supportent un rôle suppresseur de tumeurs pour Cdx2 dans le développement de cancer colorectal. En premier lieu, Cdx2 a été rapporté pour réguler de façon négative la prolifération des cellules épithéliales intestinales normales et cancéreuses en culture (Lorentz et al., 1997; Suh et al., 1994), probablement en inhibant l'activité de la voie Wnt/ β -caténine (Guo et al., 2009). Le modèle de souris hétérozygote pour Cdx2 développe des hamartomes ou polypes dans le côlon (Beck et al., 1999). Dans le même sens, le génotype $Cdx2^{+/-}$ augmente également le nombre de polypes coloniques chez la souris $APC^{Min/+}$ (Aoki et al., 2003) et accélère la tumorigénèse colonique induite par le traitement à l'azoxymethane, un agent carcinogène (Bonhomme et al., 2003). Il a également été démontré qu'un faible niveau d'expression de Cdx2 pouvait augmenter l'instabilité chromosomique (Aoki et al., 2003). Curieusement, il a été récemment suggéré que Cdx2, indépendamment de son activité transcriptionnelle, exerçait une fonction de suppresseur de tumeurs en stabilisant l'inhibiteur du cycle cellulaire $p27^{Kip1}$ (Aoki et al., 2011). Certaines

études rapportent aussi que l'expression des transcrits ou de la protéine Cdx2 dans les tumeurs humaines colorectales est réduite (Hinoi et al., 2001 et 2003) ou perdue (Ee et al., 1995; Mallo et al., 1997 et 1998; Okon et al., 2004). D'autres études montrent cependant que son expression est maintenue dans la majorité des tumeurs en comparaison avec le tissu sain adjacent (Kaimaktchiev et al., 2004; Werling et al., 2003; Wong et al., 2011). Ces contradictions pourraient suggérer la présence d'autres mécanismes (*c.-à-d.* la réduction de son pouvoir transcriptionnel) impliqués dans la perte de fonction de Cdx2 dans les cellules tumorales. Quoi qu'il en soit, ces résultats suggèrent que Cdx2 pourrait jouer un rôle suppresseur de tumeurs et que sa perte de fonction pourrait accélérer la tumorigénèse colorectale.

Nous avons également évalué l'expression et la phosphorylation sur sérine-60 de Cdx2 dans une série de lignées CRC humaines (Résultat - Annexe I). Nous avons observé que les niveaux protéiques de Cdx2 variaient beaucoup d'une lignée cellulaire à l'autre. Un fait intéressant, les lignées cellulaires exprimant un bon niveau de Cdx2 possèdent aussi un bon degré de phosphorylation sur la sérine-60. Cela nous conduit à proposer l'hypothèse que cette phosphorylation inhibitrice de Cdx2 réduirait son pouvoir transcriptionnel et participerait au processus de carcinogénèse dans le cas où son expression est maintenue. Cette hypothèse devra faire l'objet d'analyses plus approfondies, de même que le parallèle qui pourrait exister dans les tumeurs humaines en fonction du statut des activateurs de la signalisation MEK/ERK et du niveau de différenciation du tissu. Il serait aussi intéressant d'évaluer l'impact de l'expression du mutant non phosphorylable de Cdx2 (Cdx2/S60A), en comparaison avec le Cdx2 sauvage, sur le niveau de différenciation, le rythme de prolifération ainsi que sur le potentiel tumorigénique des différentes lignées CRC. À notre connaissance, aucune étude ne s'est intéressée à l'analyse de l'activité transcriptionnelle de Cdx2 durant la carcinogénèse colorectale. Néanmoins, nos résultats suggèrent que l'activité oncogénique du sentier MEK/ERK inhibe l'activité transcriptionnelle de Cdx2 et interfère avec le programme de différenciation entérocytaire, ce qui pourrait favoriser la tumorigénèse.

Un autre aspect qui serait intéressant à évaluer est la répression transcriptionnelle de Cdx2 par les facteurs de transcription régulant l'EMT. Précédemment, une étude avait démontré que Snail1 et Snail2 étaient capables de lier le promoteur de Cdx2 et de réprimer son expression (Gross et al., 2008). Les auteurs de cette étude ont corrélé le niveau d'expression de Cdx2, régulé par Snail1/2, avec la capacité de dissémination des cellules cancéreuses dans des modèles de xénogreffes. Par la suite, l'étude de Krueger et collaborateurs a démontré que l'activation de la voie RAS/RAF/MEK/ERK dans la lignée cancéreuse colorectale DLD-1 causait une réduction du niveau des transcrits de Cdx2, mais sans avoir identifié les effecteurs impliqués dans cette répression (Krueger et al., 2009). De notre côté, nous avons déjà caractérisé le rôle positif de l'activité MEK/ERK sur l'expression des facteurs Snail1 et Snail2 dans les cellules IEC-6, ainsi que dans les lignées CRC humaines (Manuscrit 2). Il serait donc intéressant de corrélérer l'expression de Snail1/2 et de Cdx2 en fonction du niveau d'activité MEK/ERK dans les lignées CRC ainsi que dans les tumeurs humaines. Ces évidences mettraient peut-être en lumière un autre mécanisme par lequel l'activation constitutive du sentier MEK/ERK, induite par les mutations oncogéniques de KRAS et BRAF, réprime la fonction de Cdx2 et cause la dérégulation des mécanismes de contrôle du statut prolifération-différenciation des CEIs observées durant la progression de la tumorigénèse colorectale.

2.2 Implication de MEK1 dans l'induction d'une transition épithélium-mésenchyme dans les cellules épithéliales intestinales (Manuscrit 2).

La transition épithélium-mésenchyme est une forme de plasticité cellulaire durant laquelle les cellules épithéliales vont perdre les caractéristiques qui leurs sont propres pour acquérir une morphologie ainsi que certaines propriétés associées aux cellules mésenchymateuses. Au niveau du cancer du côlon, l'EMT promeut l'invasion tumorale, la formation de métastases et joue un rôle clé dans la dissémination des tumeurs colorectales (Berox et al., 2007). L'infiltration des cellules tumorales au sein du tissu environnant nécessite le bris des interactions cellules-cellules telles que les jonctions serrées et adhérentes, permettant aux cellules cancéreuses de quitter la masse tumorale. Nous avons émis l'hypothèse que l'hyperactivation du sentier MEK/ERK dans cellules épithéliales intestinales pouvait être suffisante pour induire un processus de reprogrammation morphologique associée à une

transition épithélium-mésenchyme leur conférant ainsi des capacités invasives et métastatiques. Pour valider cette hypothèse, nous avons utilisé des modèles de xéno greffe de cellules IEC-6 transformées par le mutant caMEK1 afin d'évaluer leur potentiel à former des tumeurs invasives et caractériser les mécanismes moléculaires de l'EMT impliqués.

Nos résultats démontrent que l'activation constitutive du sentier MEK/ERK est suffisante pour induire la transformation cellulaire ainsi que l'EMT des cellules épithéliales intestinales d'origine cryptale. L'expression de la forme constitutive active de MEK1 (et non de la forme sauvage) induit une perte des caractéristiques épithéliales au profit de l'apparition de propriétés associées aux cellules mésenchymateuses. En premier lieu, le mutant caMEK1 induit la perte de l'expression et de la localisation des marqueurs épithéliaux tels que la E-cadhérine, l'occludine et ZO-1 et ce, au profit de l'expression de marqueurs mésenchymateux tels que la vimentine et la N-cadhérine. La diminution de la E-cadhérine constitue le changement moléculaire-clé de l'EMT. En effet, cette protéine contrôle l'adhésion cellules-cellules et sa déstabilisation mène à la perte de l'architecture épithéliale (Guarino et al., 2007; Peinado et al., 2004). Les cellules épithéliales intestinales exprimant le caMEK1 démontrent un changement de morphologie associé à l'élongation de la forme cellulaire, à une perte des contacts cellules-cellules et à l'acquisition d'une morphologie fibroblastique en comparaison aux cellules exprimant la forme sauvage de MEK1. En support à nos résultats, des études effectuées dans le modèle cellulaire MDCK ont démontré que l'expression de caMEK1 était suffisante pour induire une déstabilisation de l'architecture cellulaire et transformer ces cellules épithéliales polarisées en cellules mésenchymateuses possédant des capacités de migration accrues (Montesano et al., 1999; Schramek et al., 2003). De plus, l'expression du caMEK1 a été précédemment démontrée comme étant capable d'induire des changements dans la morphologie épithéliale des lignées épithéliales intestinales IEC-6 et RIE (Komatsu et al., 2005; Chen et al., 2006; Voisin et al., 2008). Ainsi, nous avons caractérisé l'induction d'une transition épithélio-mésenchymateuse des CEIs normales induite par la forme constitutive active de MEK1. Notre étude se distingue de celles précédemment rapportées par l'identification des mécanismes moléculaires par lesquels MEK1 induit ces phénotypes (voir également section 2.4).

Les changements moléculaires associés à l'EMT sont généralement dus à l'expression de facteurs de transcription régulant la morphologie épithéliale ainsi que l'établissement des complexes de jonction. Dans les cellules exprimant le caMEK1, nous avons observé une augmentation de l'expression de Snail1 et Snail2, deux facteurs de transcription connus pour réguler le programme transcriptionnel de l'EMT. L'utilisation du U0126 (l'inhibiteur de MEK1/2) bloque leur expression de même que les changements morphologiques, démontrant que leur expression est MEK-dépendante. Les facteurs de transcription à doigts de zinc Snail1 et Snail2 sont de forts répresseurs transcriptionnels de la E-cadhérine et sont capables d'induire l'EMT dans plusieurs modèles cellulaires (Micalizzi et al., 2010). De façon conséquente, on retrouve une forte diminution des niveaux protéiques ainsi que du messager de la E-cadhérine dans les cellules exprimant le mutant caMEK1. Snail1 n'est pas seulement un régulateur clé de l'EMT, il joue également un rôle important dans la survie cellulaire, dans la répression de la réponse immune et dans le maintien du statut souche des cellules tumorales (Wu et Zhou, 2010). Il a notamment été démontré comme étant nécessaire et responsable de l'EMT induite par le HGF dans les cellules HepG2; son induction dépend d'ailleurs de l'activation de ERK1/2 (Grotegut et al., 2006). Également, des essais de xénogreffes de cellules MDCK ont démontré que Snail1 est principalement retrouvé surexprimé dans les cellules localisées au front invasif et est responsable de la perte des contacts cellulaires médiés par la E-cadhérine ainsi que l'invasion qui lui est associée (Peinado et al., 2004). D'autres répresseurs transcriptionnels ont aussi été rapportés pour leur implication dans l'induction de l'EMT, notamment E47, Twist et SIP1 (Batlle et al., 2000; Peinado al., 2004). Puisque nous n'avons pas observé de modulation d'expression de ces derniers dans nos modèles cellulaires, l'accent a porté sur l'évaluation des mécanismes de régulation de Snail1 et Snail2 par caMEK1.

Il est important de préciser que dans le cancer colorectal, l'association entre l'apparition de l'EMT et la mutation oncogénique de KRAS reste à démontrer (Smakman et al., 2005). En effet, bien que la mutation oncogénique de KRAS soit fréquemment retrouvée dans les CEIs formant les foyers de cryptes aberrantes, ces cellules conservent tout de même leur polarité ainsi que leurs jonctions intercellulaires (Pretlow et Pretlow, 2005). Ceci suggère que l'acquisition de la mutation de KRAS, durant le développement du cancer, n'est pas

suffisante à elle seule pour induire l'EMT. Dans la même optique, la dé-différenciation des cellules cancéreuses observée au niveau du carcinome primaire est fréquemment renversée dans les cellules qui composent les foyers métastatiques. Cette observation suggère la forte implication du microenvironnement dans le contrôle de la différenciation et de l'EMT des cellules cancéreuses, suggérant encore une fois que la surexpression ou la mutation oncogénique de KRAS ne serait pas suffisante à elle seule. Selon le modèle proposé par Vogelstein, la mutation KRAS est la plus fréquemment observée dans la progression de l'adénome en carcinome, suivit des délétions fréquentes du gène SMAD4 qui est impliqué dans la voie du TGF- β (Vogelstein et al., 1988). Ainsi, la contribution de KRAS dans la carcinogénèse colorectale pourrait être intimement liée à l'activation aberrante de ce sentier de signalisation. Plusieurs études ont démontré que la signalisation du TGF- β coopère avec les formes oncogéniques de RAS pour induire la dé-différenciation des cellules épithéliales (Davies et al., 2005; Janda et al., 2002; Oft et al., 1996; 1998; 2002). De même, il a été rapporté chez la souris que l'inactivation de la signalisation du TGF- β , combinée à l'expression de la forme oncogénique de KRAS dans l'épithélium intestinal, conduit à la formation de néoplasies intestinales et de métastases (Trobridge et al., 2009). En somme, ces évidences suggèrent que durant la carcinogénèse colorectale, la dé-différenciation et l'EMT des cellules épithéliales coloniques pourraient nécessiter l'action combinée de la mutation KRAS et de la perte de la signalisation du TGF- β . Ainsi, il serait intéressant d'évaluer la contribution de la voie du TGF- β dans la transformation et l'EMT des CEIs induite par l'expression du caMEK1.

2.3 Implication de la voie MEK/ERK dans les processus d'invasion tumorale et de formation de métastases.

Plusieurs évidences supportent le rôle déterminant de l'EMT dans la formation de tumeurs invasives et métastatiques ainsi que dans la dissémination des cellules tumorales (Roads et al., 1997; De Craene et Berx, 2013). Pour mieux évaluer l'implication de l'activation constitutive du sentier MEK/ERK dans l'invasion et la formation de métastases, nous avons injecté les cellules IEC-6 caMEK1 dans la veine de la queue de la souris immunodéficente. Nous avons observé une formation rapide et importante de métastases pulmonaires chez les souris injectées; en comparaison aucune métastase n'a été observée chez les souris injectées

avec les cellules IEC-6 wtMEK1. Il est important de noter l'injection de cellules tumorales dans la veine de la queue possède certaines limitations comme modèle de progression métastatique, étant donné que les cellules cancéreuses n'ont pas à digérer la matrice extracellulaire pour rejoindre la circulation sanguine. L'utilisation de greffes ou injections orthotopiques dans le cæcum de souris immunodéficientes permettrait de mieux évaluer le potentiel métastatique de ces cellules. Le groupe du Pr.Meloche a précédemment démontré que l'injection de cellules IEC-6 exprimant caMEK1 ou caMEK2, dans le cæcum de souris immunodéficientes, induit la formation de foyers métastatiques (Voisin et al., 2008). Dans nos essais, nous avons également détecté la présence de cellules métastatiques au niveau du poumon et du foie des souris immunodéficientes suite à la formation de tumeurs sous-cutanées. Ces résultats confirment le potentiel invasif induit par l'activation constitutive du sentier MEK/ERK. D'autres études ont également suggéré l'implication de l'activité MAPK/ERK dans l'invasion et la formation de métastases (Reddy et al., 2003; Sivaraman et al., 1997). Par exemple, une activité ERK1/2 élevée a été détectée dans les cellules métastatiques en comparaison aux cellules non-métastatiques du cancer du sein (Coutts et al., 1998; McCawley et al., 1999; Adeyinka et al., 2002).

En plus de la transformation cellulaire et de la capacité à croître en indépendance d'ancrage, la formation de tumeurs métastatiques nécessite l'acquisition d'autres propriétés tumorales telles que la motilité cellulaire, la survie en indépendance d'ancrage de même que la sécrétion d'enzymes protéolytiques capables de digérer la matrice extracellulaire. Ainsi, pour pouvoir s'échapper de la masse tumorale primaire et établir des métastases distantes, les cellules tumorales doivent dégrader la membrane basale de même que la matrice extracellulaire pour atteindre la circulation sanguine. L'invasion de la *lamina propria* et de la *muscularis mucosae* sont, en autres, des marqueurs histologiques utilisés pour fixer la transition d'un adénome en carcinome invasif (Woodhouse et al., 1997). La dégradation de la matrice extracellulaire est initiée par la sécrétion de diverses protéases extracellulaires (métallo, sérine, aspartique et cystéine) qui jouent un rôle central dans la progression et l'invasion des cellules tumorales. Une augmentation de l'expression et l'activité de certaines métalloprotéases dans le cancer a d'ailleurs déjà été associée à l'activité MEK/ERK ainsi qu'aux facteurs de transcription ETS et AP-1 (Ma et al., 2012;

Yu et al., 2007). Mes résultats montrent que la forme active de MEK1 induit l'expression transcriptionnelle et la sécrétion dans le milieu extracellulaire des enzymes protéolytiques MT1-MMP, MMP-2, MMP-9 et uPA. L'utilisation du U0126 bloque leur expression et leur activité dans le milieu de culture, suggérant qu'elle dépend de l'activité de MEK. Grâce à des essais en chambres d'invasion sur matrigel, j'ai montré que les capacités d'invasion des cellules transformées par caMEK1 sont étroitement associées avec cette sécrétion de ces métalloprotéases. En effet, l'utilisation d'un inhibiteur pharmacologique des MMP2/9 a confirmé leur implication en réduisant de façon significative leurs capacités invasives. L'effet obtenu reste partiel, suggérant l'implication d'autres protéases extracellulaires telles que la MMP10, MMP13 et la cathepsine L, précédemment rapportées pour être également augmentées suite à la surexpression des formes actives de MEK1 ou de MEK2 (Voisin et al., 2008). Finalement, notre analyse des cellules IEC-6 caMEK1 en culture ainsi que des tumeurs sous-cutanées issues de ces cellules révèle l'expression de gènes fortement associés la formation de métastases colorectales, notamment la *cyclooxygenase-2 (COX-2)*, l'*osteopontine (OPN)* et l'*uPA* (Eisinger et al., 2007; Agrawal et al., 2003; Irby et al., 2004). Nos résultats sont supportés par l'étude de Komatsu et collaborateurs qui a également démontré, dans les cellules IEC-6, que l'*osteopontine*, *COX2* et *uPAR* sont bien des cibles transcriptionnelles de l'activité oncogénique de MEK1 (Komatsu et al., 2005). Notons que l'expression d'uPA (Andreasen et al., 1997), de COX-2 (Peng et al., 2013) et OPN (Agrawal et al., 2002) ont été associées à un mauvais pronostic de survie des patients atteints du cancer du côlon.

Nos résultats démontrent également une forte expression de l'intégrine $\alpha 6$ dans les tumeurs sous-cutanées issues des cellules IEC-6 caMEK1. L'intégrine $\alpha 6\beta 4$, aussi nommée TSP-180 ou A9, a initialement été caractérisée comme un antigène tumoral (Kennel et al., 1989; Van Waes et al., 1991); l'augmentation de son expression ou un changement dans sa distribution corrèle avec l'agressivité des tumeurs ainsi qu'avec un mauvais pronostic de survie (Falcioni et al., 1988; Wolf et al., 1990). L'expression des intégrines $\alpha 6\beta 1$ et $\alpha 6\beta 4$ a été rapportée pour jouer un rôle crucial pour l'adhésion des cellules cancéreuses au niveau du foie (Enns et al., 2005; 2006). Dans les carcinomes colorectaux, l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ est notamment associée avec le potentiel invasif et métastatique en régulant l'expression de

plusieurs gènes pro-métastatiques (Mariotti et al., 2001; Shaw et al., 1997; Trusolino et al., 2001). Ainsi, ces intégrines participent à la progression tumorale via leurs interactions avec la MEC de même qu'en régulant les voies de signalisation qui contrôlent la dynamique des structures d'actine, la motilité cellulaire de même que la prolifération et la survie des cellules cancéreuses (Rabinovitz et Mercurio, 1997; Rabinovitz et al., 1999; Mercurio et Rabinovitz, 2001). Dans l'ensemble, l'expression de la forme constitutive active de MEK1 est suffisante pour induire la dissémination des cellules tumorales, probablement via l'expression de ces multiples facteurs connus pour promouvoir l'invasion et la formation de métastases.

2.4 Régulation des facteurs de transcription Snail1 et Snail2 dans l'EMT induite par l'hyperactivation de MEK1.

Mes résultats démontrent que la surexpression stable d'un mutant hyperactif de MEK1, dans les cellules IEC-6, est suffisante pour induire une transformation morphologique de type EMT et capable d'induire la formation de tumeurs invasives et métastatiques *in vivo*. Néanmoins, les mécanismes moléculaires impliqués restaient à éclaircir. Dans le but de mieux comprendre les mécanismes de régulation de l'EMT par l'activité MEK/ERK, nous avons tenté d'identifier les effecteurs responsables de l'expression des répresseurs transcriptionnels Snail1 et Snail2.

Ainsi, nous avons analysé les éléments de réponse contenus dans son promoteur de Snail1 à l'aide de logiciels informatiques (MathInspector, TESS). Nos résultats ont notamment permis d'identifier de fortes séquences de liaisons pour le facteur EGR-1. Une étude a précédemment rapporté que EGR-1 liait directement le promoteur de Snail1 et serait responsable de son expression (Thiel et al., 2002). Dans notre modèle de transformation, nous observons une très forte expression de EGR-1, induite par le mutant actif de MEK1. L'utilisation d'un shRNA dirigé contre EGR-1 diminue l'expression de Snail1, confirmant l'existence d'un lien entre les deux gènes. Ainsi, toutes ces évidences suggèrent donc que le sentier MEK/ERK/EGR-1 promeut l'EMT dans les cellules épithéliales intestinales. Finalement, nos résultats démontrent clairement que la forme hyperactivée de MEK1 augmente le niveau d'association de EGR-1 au promoteur de Snail1 (ChIP). Une

corrélation similaire a déjà aussi été rapportée dans les carcinomes hépatiques où les capacités de migration et d'invasion induites par le HGF sont dépendantes de la signalisation ERK/EGR-1, qui contrôle l'expression de Snail1 nécessaire à la répression de la E-cadhérine (Grotegut et al., 2006).

De son côté, l'analyse du promoteur de Snail2 a démontré de multiples éléments de réponse pour les complexes transcriptionnels AP-1. Ces derniers agissent généralement en complexe d'homo- ou hétérodimères et sont divisés en deux sous-familles de proto-oncogènes : Fos (c-Fos, FosB, Fra-1 et Fra-2) et Jun (c-Jun, JunB et JunD) (Zhang et al., 2005). L'activation des complexes AP-1 joue un rôle important dans la tumorigénèse, elle est notamment essentielle à l'initiation et la progression tumorale (Young et al., 2003). Les membres de la famille des complexes AP-1 ont maintes fois été démontrés comme étant des cibles transcriptionnelles de l'activité ERK (Balmanno et Cook, 1999; Hill et al., 1993). Il a été démontré que la modulation de l'activité et de la composition des complexes AP-1 sont fortement impliquées dans la transformation des fibroblastes NIH3T3 par RAF-1 (Cook et al., 1999), par MEK1 (Treinies et al., 1999) et des CEIs par la forme oncogénique de HRAS (Mechta et al., 1997). Dans notre modèle de transformation, Fra-1 est le seul membre des complexes AP-1 à être fortement augmenté par l'activation constitutive de MEK1. Des essais d'immunoprécipitation de la chromatine démontrent également une augmentation de la liaison de Fra-1 au promoteur du gène Snail2. À notre connaissance, ceci est la première démonstration de l'implication du complexe AP-1 dans la régulation de l'activité du promoteur Snail2. L'utilisation de shRNA dirigé contre le messenger de Fra-1 a d'ailleurs diminué l'expression de Snail2, confirmant la corrélation entre ces deux gènes. Nos essais n'ont pu démontrer la liaison de Fra-1 au site AP-1 du promoteur de Snail1, bien que celle-ci ait déjà été décrite dans les cellules MDCK et IEC-18 (Peinado et al., 2003; Barberà et al., 2004). Ceci n'exclut pas l'implication de ce site ou d'un autre site AP-1 dans la régulation de Snail1, de même que la contribution des autres membres des complexes AP-1 potentiellement impliqués dans la transformation cellulaire induite par caMEK1. Une observation intéressante est l'effet puissant de shARN dirigé contre Fra-1 sur la transformation morphologique des cellules IEC-6 caMEK1. En effet, la réduction des niveaux de Fra-1 corréle avec un renversement important de l'élongation de la forme

cellulaire ainsi qu'un rétablissement des contacts cellules-cellules (observation non présentée dans le Manuscrit 2). Il serait donc pertinent d'évaluer le rôle exact de Fra-1 dans la transformation et l'EMT induite par l'hyperactivation de MEK1. Notamment, il faudrait déterminer si l'expression de Fra-1 est nécessaire à l'initiation et au maintien du statut transformé en utilisant une combinaison de modèles inductibles et stables de transformation dépendante de l'activité de MEK. D'autres études démontrent d'ailleurs un rôle important de Fra-1, comme cible de l'activité MEK/ERK, dans les cellules CRC. En effet, l'activité ERK élevée protège Fra-1 contre la dégradation protéasomale dans les cellules cancéreuses du côlon, prévenant ainsi l'apoptose induite par la perte d'ancrage à la matrice (Vial et Marshall., 2003). De plus, Fra-1 est impliqué dans l'EMT induite par HRAS et par KRAS en contrôlant l'expression de la vimentine et ce, en lien avec l'augmentation de la migration des cellules CRC (Andreolas et al., 2008). De façon similaire, la forme oncogénique de KRAS utilise la signalisation MEK/ERK/Fra-1 pour entraîner la dérégulation de la signalisation de Rho impliquée dans le désassemblage du cytosquelette d'actine (Pollock et al., 2005). Ainsi, nos résultats et d'autres supportent fortement l'implication du sentier MEK/ERK/Fra-1 dans l'initiation et le maintien de la transformation des CEIs.

En résumé, nos travaux démontrent que l'expression d'une forme constitutive active de MEK1 dans les CEIs est suffisante pour induire l'EMT via l'induction des facteurs de transcription EGR-1 et Fra-1. Le rôle central de Snail1 et Snail2 dans l'induction de l'EMT des cellules CRC humaines a déjà été bien caractérisé (Krishnamachary et al., 2006). Nos résultats mettent en évidence l'étroite relation qui existe entre l'activité ERK1/2, l'expression de EGR-1 et Fra-1 ainsi que l'induction de Snail1 et Snail2 dans plusieurs lignées de cellules CRC humaines. En effet, l'inhibition prolongée de MEK1/2 réduit l'expression des Fra-1 et d'EGR-1 et de façon conséquente, augmente l'expression de la E-cadhérine (Résultats non présentés). Cela dit, d'autres mécanismes moléculaires sont assurément impliqués dans l'EMT des CEIs cancéreuses, notamment les signalisations découlant de la PI3K/Akt (Jhawer et al., 2008; Bowen et al., 2009), du TGF β /JNK/Smad3 (Matsuzaki et al., 2006), de Src (Chen J, 2008), de NF-kappaB (Sarkar et al., 2008) et de la β -caténine (Solanas et al., 2008). Ces protéines de signalisation sont fréquemment retrouvées mutées ou hyperactivées dans le cancer colorectal et peuvent également

contribuer à diminuer le phénotype épithélial au profit d'un phénotype plus fibroblastique et invasif. Mes travaux présentés dans le manuscrit 4 décrivent justement le rôle de l'activité β -caténine/TCF4 dans l'EMT induite par caMEK1 et KRAS^{G12V}, de même que son implication dans la régulation de Fra-1.

2.5 Identification des gènes différentiellement exprimés suite à l'activation constitutive de MEK1.

Précédemment à cette étude, une analyse par micropuces d'ADN a été réalisée par notre groupe afin de mieux définir les changements dans l'expression des gènes induits par l'expression de la forme constitutive active MEK1 dans les cellules IEC-6 (Résultats de Marie-Josée Boucher, non publiés). Les résultats obtenus par notre groupe et autres (Komatsu et al., 2006; Voisin et al., 2008), démontrent que la forme active de MEK1 module l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la prolifération, la migration, l'adhésion cellulaire ainsi que des protéines impliquées dans la composition et le remodelage de la matrice extracellulaire. L'analyse des résultats de notre micropuce a permis d'identifier le gène encodant pour la serpineE2, un inhibiteur de protéases à sérine, comme le gène le plus fortement induit par l'expression du mutant caMEK1, soit près de 30 fois. L'augmentation du transcrite de la serpineE2 a également été observée par l'équipe du professeur Meloche (Voisin et al., 2008). Comme ce gène était très fortement induit dans les cellules exprimant caMEK1, nous avons voulu évaluer le rôle et la contribution de cet inhibiteur de protéases. Nous avons donc analysé le rôle de l'activité MEK/ERK dans la régulation transcriptionnelle de la serpineE2 en plus d'évaluer son implication dans la transformation et la tumorigénèse intestinale induite par l'hyperactivation de MEK1.

2.5.1 Rôle et implication de la serpineE2 comme cible de l'activité oncogénique de RAS/ERK (Manuscrit 3)

La serpineE2, aussi connue sous le nom de PN-1 (Protease Nexin-1), est une glycoprotéine sécrétée membre de la grande famille des serpines, un groupe de protéines ayant une structure similaire et connu pour inhiber diverses familles de protéases. Les serpines sont des régulateurs de plusieurs réponses cellulaires et tissulaires face aux changements de l'environnement. La serpineE2 est exprimée dans une variété de types cellulaires incluant

les cellules endothéliales, les plaquettes, les neurones (Bouton et al., 2007), la prostate (Gao et al., 2008) et le pancréas (Nagahara et al., 2010). L'analyse de son expression provenant des études du Broad Institute rapporte également sa présence dans une multitude de tissus, mais de façon plus abondante dans la peau, le rein, le foie et le côlon (www.broadinstitute.org). La serpineE2 est un inhibiteur de protéases à sérine principalement connu pour lier et inhiber la thrombine, l'uPA, le tPA et la trypsine (Baker et al., 1980; Stone et al., 1987). La majorité de la littérature concernant la fonction et l'activité de la serpineE2 démontre son implication dans l'inhibition de ces protéases, notamment la thrombine dont la fonction est critique pour la coagulation (Bouton et al., 2007; 2012). Au niveau phylogénétique, la serpineE2 est très proche de la serpineE1 (également nommée aussi Plasminogen activator inhibitor-1 ou PAI-1), qui est un inhibiteur rapide et puissant des activateurs du plasminogène (tPA et uPA) (Gao et al., 2008). Le PAI-1 est capable de lier les composantes de la matrice extracellulaire (vitronectine et fibronectine) et de moduler la migration ainsi que l'adhésion cellulaire. De la même façon, la serpineE2 jouerait sur l'activité du complexe uPA/uPAR qui intervient dans les phénomènes d'adhésion, de prolifération et de migration cellulaire suite à l'activation de l'urokinase (Andreasen et al., 1997). Même si plusieurs études supportent l'implication de PAI-1 dans la progression d'une variété de cancers, le rôle exact joué par la serpineE2 reste quant à lui très peu connu. Une étude structurelle de serpineE2 a suggéré qu'elle pourrait avoir des fonctions biologiques pro-tumorales similaires à PAI-1 (Gao et al., 2008), notamment dans le contrôle de la migration et de l'angiogenèse tumorale (Bajou et al., 2008; Candia et al., 2006).

Dans notre étude, nous avons confirmé l'induction de l'expression et de la sécrétion de la serpineE2, de façon MEK-dépendante, durant la transformation des cellules IEC-6 par les formes oncogéniques KRAS^{G12V}, BRAF^{V600E} et caMEK1. Nous avons également observé que l'expression de la serpineE2 est induite très rapidement (en quelques heures) par la forme oncogénique et inductible de BRAF démontrant que l'induction de la serpineE2 est fort possiblement une conséquence directe et rapide de la signalisation MEK/ERK. En support à ce résultat, nous observons que l'inhibition de l'activité endogène de MEK (U0126), dans les cellules CRC humaines HCT116 et LoVo, atténue l'expression de la

serpineE2 d'environ 50%. Cette diminution reste partielle, ce qui suggère la présence d'autres mécanismes impliqués dans le contrôle de son expression dans les cellules CRC. D'ailleurs l'activation du récepteur tyrosine kinase MET a été associée à l'induction de la serpineE2 dans des modèles de xénogreffes de cellules CRC (van der Horst et al., 2009). De même, il a été démontré que la signalisation de la PI3K pouvait également augmenter l'expression de la serpineE2 dans les MEF issus des souris invalidées pour PTEN (Li et al., 2006).

Nous avons observé une forte expression du messager de la serpineE2 dans les adénomes et carcinomes colorectaux en comparaison au tissu sain adjacent. L'augmentation de l'expression de la serpineE2 semble se produire tôt dans la carcinogénèse colorectale, étant donné un fort niveau d'expression déjà observé dans tous les adénomes colorectaux que nous avons testés. Fait intéressant, ces adénomes présentaient des mutations oncogéniques de KRAS ou BRAF. Des observations similaires ont déjà été rapportées lors d'analyses de tumeurs pancréatiques (Buchholz et al., 2003), du sein (Candia et al., 2006), de liposarcomes (Selzer-Plon et al., 2009) et dans les carcinomes squameux oraux (Gao et al., 2008). De manière similaire, une augmentation de l'expression de la serpinE2 a également été rapportée dans le cancer colorectal et semble corrélérer avec le niveau de dysplasie du tissu (Selzer-Plon et al., 2009).

L'utilisation d'un shRNA dirigé contre la serpineE2 a permis de montrer la contribution de cet inhibiteur de protéases dans la transformation cellulaire et la croissance tumorale des cellules IEC-6 induites par l'hyperactivation de MEK1. De manière surprenante, la réduction de l'expression de la serpineE2 n'a pas altéré de manière significative la vitesse de prolifération des cellules cultivées en monocouche. Par contre, nous avons observé une forte diminution de la taille (mais pas du nombre) de foyers cellulaires formés à post-confluence. Ces foyers sont formés spontanément par les cellules IEC-6 caMEK1 suivant à l'atteinte de la confluence cellulaire et sont une des premières caractéristiques observées. La réduction du nombre de foyers suggère que la serpineE2 joue un rôle dans la capacité à croître à post-confluence ainsi qu'en indépendance d'ancrage à la matrice et non dans la prolifération cellulaire en monocouche. Cette hypothèse est confirmée par la réduction de la

capacité de ces cellules à former des colonies en agarose mou. En parallèle, nous avons aussi évalué le rôle de la serpineE2 dans le contrôle de la migration cellulaire et de l'invasion tumorale, deux processus critiques impliqués dans la formation de métastases colorectales. L'utilisation d'un shRNA dirigé contre la serpineE2 dans les cellules IEC-6 caMEK1 réduit leur capacité à migrer sur membranes de polycarbonate recouvertes de fibronectine ou de vitronectine, deux matrices extracellulaires connues pour interagir avec la serpineE2 (Schroeck et al., 2002; Low et al., 1981). Des résultats similaires ont été obtenus dans les cellules cancéreuses colorectales LoVo et HCT116, deux lignées possédant une mutation activatrice de KRAS et présentant un niveau élevé d'expression de la serpineE2. Ainsi, le blocage de l'expression de la serpineE2 provoque une diminution de leur capacité à former des foyers cellulaires, à croître en agarose mou et à former des tumeurs chez la souris immunodéficiente. Pris dans l'ensemble, nos résultats obtenus dans les cellules CRC ainsi que dans les modèles de transformation des cellules IEC-6, démontrent que l'expression de la serpineE2 est impliquée dans la transformation cellulaire et la tumorigénèse colorectale.

En réduisant l'activité protéolytique extracellulaire, on pourrait penser que cet inhibiteur de protéases réduirait l'invasion cellulaire ainsi que la formation de métastases. À l'opposé, il a été démontré que l'expression de la serpineE2 augmente le potentiel invasif des tumeurs pancréatiques dans des modèles de xénogreffes (Buchholz et al., 2003), de même qu'il stimule la formation de tumeurs invasives au niveau de la glande mammaire (Guan et al., 2003) ainsi qu'au niveau du cancer du testicule (Nagahara et al., 2010). Une analyse effectuée sur 126 patientes atteintes du cancer du sein démontre que les patientes qui exprimaient un niveau élevé de serpineE2 présentaient un risque significativement plus élevé de développer des métastases pulmonaires (Fayard et al., 2009). Dans notre étude, nous avons démontré que la serpineE2 contrôle la migration et l'invasion des cellules cancéreuses, suggérant également son implication dans la formation de métastases. Cependant, le mécanisme d'action de cet inhibiteur de protéase reste à clarifier. Nous avons avancé l'hypothèse et démontré que la serpineE2 favorise le détachement des CEIs de la matrice extracellulaire, augmentant ainsi les capacités de migration cellulaire. Il serait également intéressant d'identifier les autres mécanismes moléculaires découlant de son

expression, notamment son possible contrôle des voies de signalisation régulant la migration cellulaire et l'invasion.

2.5.2 Implication potentielle de la serpineE2 dans le contrôle de l'angiogenèse tumorale?

PAI-1 est un régulateur important du système activateur du plasminogène uPA/t-PA et la surexpression de l'une de ces trois protéines dans le cancer colorectal est associée à la progression tumorale et à l'invasion lymphatique (Baker et al., 2000). Récemment, il a été rapporté que la réduction ou l'inhibition de PAI-1 dans des modèles de xénogreffes résulte en une réduction de la croissance des tumeurs liée à l'inhibition de l'angiogenèse (Gomes-Giacoa et al., 2013). Son rôle dans la néo-vascularisation tumorale avait été précédemment identifié (Bajou et al., 1998; 2001; Rakic et al., 2003). Nos résultats démontrent également que la réduction de la serpineE2 diminue le potentiel tumoral des cellules HCT116 et LoVo dans des essais de xénogreffes. Étant donné l'homologie de fonction entre PAI-1 et la serpineE2, nous avons alors émis l'hypothèse qu'elle pourrait potentiellement être impliquée dans la formation de nouveaux vaisseaux sanguins. Des essais d'angiogenèse *in vivo* ont donc été réalisés, consistant à l'implantation sous-cutanée d'inserts de matrigel contenant des cellules cancéreuses ou transformées. La sécrétion de molécules pro-angiogéniques telles que le VEGF, le FGF et PDGF permet la néo-vascularisation de l'implant à partir des vaisseaux sanguins présents dans le tissu environnant. Par quantification du taux d'hémoglobine présent dans l'insert, on peut évaluer l'impact d'un gène ou d'une drogue sur l'angiogenèse tumorale (Akhtar et al., 2002). Nos résultats préliminaires montrent que les cellules IEC-6 caMEK1 sous-exprimant la serpineE2 développent une vascularisation nettement inférieure (Annexe II). Il faut toutefois prendre ce résultat avec précaution parce qu'on ne peut exclure l'impact de la perte de la serpineE2 sur la capacité des cellules à croître en indépendance d'ancrage. En affectant le nombre de cellules présentes dans l'insert au cours de l'essai, on module de façon indirecte la quantité de facteurs pro-angiogéniques sécrétés, entraînant ainsi une diminution du niveau de vascularisation. Tout de même, que ce soit de façon directe en affectant la vascularisation (via le complexe uPA/uPAR) ou indirectement via l'effet sur la croissance en indépendance d'ancrage, ce résultat suggère que la serpineE2 pourrait avoir un rôle dans l'induction de

l'angiogenèse tumorale, probablement en coopération avec d'autres facteurs pro-angiogéniques également induits par la forme active de MEK1 tels que COX-2 (Gately et Li, 2004; Komatsu et al., 2005).

3 Implication de la voie Wnt/ β -caténine dans la transformation induite par la voie KRAS/ERK MAP kinase.

Les mutations somatiques du suppresseur de tumeur *APC* sont des événements fréquents dans les cancers colorectaux et sont détectées dans la majorité des tumeurs (Fearnhead et al., 2001). Ces mutations apparaissent précocement au cours de la tumorigénèse et sont observées dans de très petits adénomes présentant une faible dysplasie (Powell et al., 1992; Jen et al., 1994). Ainsi, jusqu'à 80% des cancers sporadiques du côlon présentent des altérations du gène *APC*. La majorité des mutations retrouvées génèrent un codon-stop qui conduit à la production d'une protéine tronquée incapable de réguler la dégradation de la β -caténine (Nagase et al., 1993; Fearnhead et al., 2001). Conséquemment, on retrouve une élévation des niveaux cytoplasmique et libre de la β -caténine dans les cellules tumorales coliques, favorisant ainsi sa translocation et son accumulation nucléaire.

In vivo, la perte de fonction d'APC telle qu'observé dans le modèle murin *APC*^{Min/+}, est suffisante pour induire la formation de polypes intestinaux causés par une dérégulation de la signalisation découlant de la β -caténine (Andreu et al., 2005). Inversement, la réexpression du gène *APC* sauvage, dans des cellules tumorales coliques présentant une mutation d'*APC*, réduit l'accumulation de β -caténine et bloque l'effet transcriptionnel constitutif du complexe β -caténine/TCF (Faux et al., 2004; Park et al., 2006). Dans les cellules coliques présentant des mutations d'*APC* ou de *β -caténine*, le complexe β -caténine/TCF4 active de façon constitutive la transcription de ses gènes cibles impliqués dans la prolifération et la tumorigénèse intestinale, notamment le gène *cycline D1* et le proto-oncogène *c-myc* (Korinek et al., 1997). L'expression de *c-myc* a d'ailleurs été démontrée comme absolument essentielle à l'apparition de polypes associés au phénotype des souris *APC*^{Min/+} (Ignatenko et al., 2006).

Même si la signalisation KRAS et la voie Wnt/ β -caténine sont les principales voies de signalisation menant à la tumorigénèse colorectale, peu d'études se sont intéressées à évaluer leurs potentielles interactions durant la carcinogénèse colorectale. Nous avons émis l'hypothèse que l'activité MEK/ERK et la voie Wnt/ β -caténine pouvaient interconnecter dans la transformation cellulaire et la tumorigénèse intestinale. Nous avons évalué le statut et la contribution du sentier Wnt/ β -caténine dans la transformation des cellules épithéliales IEC-6 induite par l'activation oncogénique de KRAS^{G12V}, BRAF^{V600E} et caMEK1; ces observations ont ensuite été corrélées dans les cellules cancéreuses et tumeurs humaines d'origine colorectale (*Manuscrit 4*).

3.1 Contrôle de l'activité du complexe β -caténine/TCF4 par l'activité MEK/ERK

Dans les cellules IEC-6, l'utilisation d'essais luciférase a montré une élévation significative de l'activité transcriptionnelle du complexe β -caténine/TCF4 est induite par l'expression des formes actives de KRAS, de BRAF et de MEK1. Nous avons aussi noté une augmentation de l'expression de *c-myc*, le gène cible par excellence du complexe, associée à une plus grande activité de son promoteur. À l'inverse, l'inhibition pharmacologique de MEK1/2 dans les cellules CRC humaines établies réduit significativement l'activité transcriptionnelle du complexe β -caténine/TCF4, de même que celle du promoteur du gène *c-myc* (mesuré par essais luciférase). De façon similaire, une étude a récemment rapporté que l'expression de la forme oncogénique de KRAS dans les cellules Caco-2 augmentait aussi l'activité et l'expression de plusieurs gènes cibles du complexe β -caténine/TCF4 (Horst et al., 2012). À l'inverse, l'activité Wnt/ β -caténine est diminuée par l'utilisation d'anticorps dirigés contre l'EGFR, le cetuximab, et est associée à une réduction de la phosphorylation des ERK1/2. Les auteurs ont également démontré que l'activité MAPK pourrait être un modulateur de l'hétérogénéité intra-tumorale déterminant l'impact de la voie Wnt/ β -caténine sur le maintien du statut souche des cellules CRC. Une autre analyse effectuée sur un grand nombre de lignées CRC humaines mutées pour KRAS a démontré que les cellules dépendantes de l'activité oncogénique de KRAS pour leur potentiel tumoral démontraient également un niveau de signalisation Wnt/ β -caténine nettement plus élevé (Singh et al., 2012). Les auteurs ont ainsi identifié une sous-catégorie de cellules CRC où KRAS augmente la signalisation Wnt/ β -caténine via l'activation de TAK1 par le facteur

BMP-7. Dans l'ensemble, ces études et autres rapportent une augmentation de la signalisation Wnt induite par l'expression de la forme oncogénique de KRAS (Janssen et al., 2006; Phelps et al., 2009; Singh et al., 2012; Horst et al., 2012) ainsi que de BRAF (Carragher et al., 2010; Rad et al., 2013), suggérant la présence d'une possible interconnexion entre ces deux voies de signalisation, probablement dans certains sous-types de cancers colorectaux.

Le contexte de la mutation KRAS dans le cancer du côlon est complexe, cette mutation survient durant la progression d'un adénome vers le stade du carcinome après la mutation d'*APC* (Vogelstein et al., 1998). Dans les cellules CRC établies, ces deux mutations sont fréquemment retrouvées simultanément. D'ailleurs, environ la moitié des lignées qui possèdent à la fois les mutations *KRAS* et *APC* semblent dépendre de ces deux voies de signalisation pour leur survie (Singh et al., 2012). De façon intéressante, le degré de dépendance des différentes lignées CRC aux oncogènes KRAS (Singh et al., 2012) ou BRAF (Mologni et al., 2012) corrèle avec le degré d'activation de la signalisation Wnt. Ainsi, il devient de plus en plus évident que l'impact des mutations oncogéniques de *KRAS* et *BRAF* est intimement lié à une activation de la signalisation Wnt.

Il faut mentionner que l'augmentation de l'expression protéique de c-myc dans nos modèles cellulaires pourrait être également attribuable à sa phosphorylation sur la sérine-62 par les kinases ERK1/2, connues pour inhiber sa dégradation par le protéasome (Sears et al., 2000). Néanmoins, nos résultats associent clairement une forte activité MEK avec une hausse du messenger de c-myc, suggérant une régulation transcriptionnelle. De plus, nous avons observé la régulation du messenger des autres gènes cibles de la voie Wnt/ β -caténine tels que *Axine2* et *LEF-1*, qui sont aussi induits de façon MEK-dépendante par *KRAS*^{G12V} ou caMEK1. Dans les cellules DLD-1 et HT-29, l'inhibition pharmacologique de MEK1/2 réduit la transactivation du promoteur de *c-myc* et l'expression de son messenger. En parallèle, nous observons une réduction de la localisation nucléaire de la β -caténine de même que de son interaction nucléaire avec son partenaire nucléaire TCF4; ces observations corrèlent avec la réduction de son activité transcriptionnelle. De plus, l'inhibition prolongée de MEK1/2 cause une réduction du niveau d'association du

complexe β -caténine/TCF4 avec le promoteur du gène *c-myc*. Certaines de ces observations ont également été confirmées dans les SW480 et HCT116, deux lignées présentant également la mutation oncogénique de KRAS. Ainsi, nos résultats sont donc en accord avec l'étude de Horst et collaborateurs (Horst et al., 2012) qui démontre dans des modèles de xénogreffes de cellules Caco-2 exprimant KRAS^{G12V}, qu'une forte phosphorylation des ERK1/2 corrèle avec une activité β -caténine/TCF4 élevée, associée à une localisation nucléaire de la β -caténine.

3.2 L'activité du complexe β -caténine/TCF4 participe au potentiel tumorigénique de MEK1.

Bien que l'on observe une augmentation de l'activité et des gènes cibles du complexe β -caténine/TCF4, la réelle contribution de ce sentier de signalisation dans la transformation des cellules IEC-6 restait à clarifier. Pour ce faire, nous avons utilisé une forme dominante négative de TCF4 (Δ NTCF4) connue pour bloquer l'activité du complexe β -caténine/TCF4 (Korinek et al., 1997). Il a été démontré que l'expression de ce même mutant, dans la lignée cancéreuse DLD-1, réduit l'empilement cellulaire et restaure une monocouche de cellules cylindriques mieux polarisées (Naishiro et al., 2001). Dans les IEC-6 caMEK1, l'expression du Δ NTCF4 réduit significativement l'activité du promoteur de *c-myc* de même que son transcrit et ses niveaux protéiques. En parallèle à la réduction des gènes cibles du complexe β -caténine/TCF4, on observe un renversement partiel de la transformation morphologique associée à l'EMT, à la restauration d'une morphologie plus épithéliale qui est potentiellement attribuable à l'augmentation des niveaux de la E-cadhérine. Ces résultats sont importants et novateurs, ils démontrent la contribution du sentier Wnt/ β -caténine dans la transformation des CEIs induite par l'activation oncogénique du sentier MEK/ERK. Aucune évidence similaire n'a jusqu'à maintenant été rapportée dans la littérature, ces résultats ouvrent la voie vers de nouvelles perspectives de recherches.

De manière intéressante, nous avons observé une forte diminution de l'expression du facteur de transcription Fra-1 dans les cellules exprimant le mutant de TCF4. Fra-1 a déjà été rapporté pour être un gène cible de la voie Wnt/ β -caténine (Kikuchi A., 1999) et nous avons précédemment démontré son rôle clé dans l'induction de l'EMT des cellules IEC-6

induite par l'expression du caMEK1 (régulateur de l'expression de Snail2 - Manuscrit 2). Il est important de noter que Fra-1 est une cible de ERK1/2, qui influence à la fois sa transcription et sa stabilité (Vial et Marshall, 2003). Cependant, comme l'expression du Δ NTCF4 n'affecte pas l'activité ERK1/2 des cellules IEC-6 transformées, nous pouvons supposer que ce mécanisme n'est pas impliqué dans la baisse d'expression de Fra-1, de même que sur la réduction du niveau de transformation morphologique. Une autre étude a également rapporté la régulation transcriptionnelle de Fra-1 par l'expression du mutant caMEK1, mais sans établir les mécanismes moléculaires impliqués (Komutsu et al., 2006). De leurs côtés, mes résultats suggèrent que l'hyperactivation de MEK1 induit l'activation du complexe β -caténine/TCF4 responsable de l'expression de Fra-1 qui, à son tour, induit l'expression de Snail2, un répresseur de la E-cadhérine. Ces résultats sont confirmés par l'utilisation d'un inhibiteur micromolaire de l'interaction entre β -caténine et CBP, le ICG-001, qui bloque le potentiel de transactivation du complexe β -caténine/TCF4 et cause une réduction du niveau de transformation morphologique des cellules IEC-6 caMEK1, en plus d'induire un retour vers une morphologie plus épithéliale. Ainsi, les différents résultats obtenus suggèrent que les effets oncogéniques découlant du mutant de MEK1 dépendent en partie de sa capacité à induire l'activation du complexe β -caténine/TCF4. Il serait important de faire ce même parallèle sur les effets oncogéniques de KRAS et BRAF dans les lignées CRC présentant ou non la mutation du gène *APC*. Plus globalement, il serait intéressant d'identifier les gènes cibles régulés de façon différentielle par l'activation oncogénique du sentier MEK/ERK dans un contexte d'activation ou d'inhibition de la voie Wnt/ β -caténine.

Nos résultats montrent également que l'expression du mutant Δ NTCF4 dans les cellules transformées par le mutant caMEK1 cause un ralentissement de la prolifération, de la capacité de ces cellules à croître en indépendance d'ancrage de même qu'à former des tumeurs sous-cutanées, lorsqu'injectées chez la souris immunodéficiente. De plus, nous observons une diminution du nombre de métastases pulmonaires formées suite à l'injection des cellules dans la veine de la queue de ces souris. En parallèle, nous avons mesuré une réduction des capacités de migration et d'invasion sur matrigel des cellules exprimant le Δ NTCF4. Plusieurs études ont rapporté un rôle activateur de la voie Wnt/ β -caténine dans l'expression de métalloprotéinases impliquées dans l'invasion, notamment la MMP-7

(Brabletz et al., 1999) ainsi que les gélatinases MMP2 et MMP9 (Wu et al., 2007). Il serait donc intéressant d'évaluer l'impact de l'expression du Δ NTCF4 ou du traitement au ICG-001 sur les niveaux d'expression de ces protéases, de même que leur activité dans le milieu de culture suite à l'induction de la transformation par les formes actives de MEK1 ou même de KRAS et BRAF.

3.3 Mécanisme de régulation de l'activité du complexe β -caténine/TCF4 par l'activation constitutive de MEK1.

Nos résultats montrent donc que l'hyperactivation de la voie KRAS/ERK stimule le complexe transcriptionnel β -caténine/TCF4, lequel s'avère d'ailleurs important pour plusieurs aspects de la transformation des CEIs. Une étude effectuée dans les chondrocytes de rat a récemment rapporté que l'activité ERK1/2, découlant de l'activation de certains récepteurs tyrosine kinase, était capable d'induire la phosphorylation du co-récepteur des Wnts LRP6 (Krejci et al., 2012). Plus spécifiquement, les kinases ERK1/2 sont capables de phosphoryler directement LRP6 sur la sérine 1490 et la thréonine 1572 et ce, lorsque la protéine est en cours de maturation au niveau du Golgi. Cette phosphorylation de LRP6 a alors été associée à l'augmentation de l'activité du complexe β -caténine/TCF4 et à l'accumulation nucléaire de la β -caténine. Dans les CEIs transformées par KRAS^{G12V} et caMEK1, nous observons également cette augmentation de la phosphorylation de LRP6 sur la sérine 1490 et principalement sur la thréonine 1572. L'augmentation de l'activité du complexe β -caténine/TCF4 par KRAS^{G12V} ou caMEK1 semble dépendre de ces phosphorylations puisque l'expression d'une forme non phosphorylable de LRP6 bloque l'hyperactivation du complexe β -caténine/TCF4 induite par KRAS^{G12V} ou caMEK1. De plus, le traitement au Wnt3a recombinant augmente fortement la location nucléaire de la β -caténine ainsi que son activité transcriptionnelle dans les cellules transformées par KRAS^{G12V} et caMEK1, en comparaison avec un effet très faible observé dans les cellules contrôles non transformées. Ainsi, les cellules transformées par KRAS^{G12V} et caMEK1 semblent beaucoup plus sensibles à la stimulation par le Wnt3a, ceci suggère que la phosphorylation MEK-dépendante de LRP6 serait nécessaire à une forte activation de ce sentier de signalisation.

De manière intéressante, l'étude de Phelps et collaborateurs a également suggéré que l'activation oncogénique de KRAS est nécessaire à l'accumulation nucléaire de la β -caténine associées à la perte de fonction d'APC chez l'humain (Phelps et al., 2009). De plus, l'étude de Carragher et collaborateurs a récemment rapporté que l'expression de l'oncogène BRAF^{V600E}, spécifiquement dans l'épithélium intestinal murin, induit de façon MEK-dépendante une hyperprolifération cryptale associée à une forte localisation nucléaire de la β -caténine (Carragher et al., 2010). Ainsi, il serait important de déterminer le rôle spécifique de ces phosphorylations de LRP6 (S1490 et T1572) sur la localisation nucléaire de la β -caténine, ainsi que d'évaluer si elle est requise pour la transformation des CEIs induite par l'activité oncogénique de la voie KRAS/ERK. Des travaux sont d'ailleurs en cours afin de vérifier si la surexpression de la forme non-phosphorylable de LRP6 (LRP6_5A ou LRP6 S1490A/T1572A) inhibe la transformation des cellules IEC-6 induite par KRAS^{G12V} ou caMEK1.

Notre étude fournit la première évidence que la phosphorylation de LRP6 sur la sérine 1490 et la thréonine 1572 est augmentée dans les cellules CRC en comparaison aux CEIs humaines normales (HIEC; Résultats non présentés). L'utilisation d'un inhibiteur pharmacologique de MEK1/2 démontre que ces phosphorylations de LRP6 sont en grande partie MEK-dépendantes dans les cellules HT-29 et DLD-1. Il sera également important d'évaluer l'impact de l'expression des formes non phosphorylables de LRP6 sur l'activité β -caténine/TCF4 ainsi que sur leur potentiel tumoral des CRCs humaines. Un résultat important de notre étude est l'augmentation de la phosphorylation de LRP6 sur la S1490 et la T1572 dans une grande proportion des tumeurs humaines colorectales en comparaison avec le tissu sain adjacent. On peut supposer que cette augmentation survient de façon précoce au niveau de la carcinogénèse colorectale puisqu'un niveau élevé de phosphorylation de LRP6 est retrouvé dans tous les adénomes colorectaux que nous avons testés. Ainsi, il serait intéressant de corrélérer le niveau de phosphorylation de LRP6 avec l'expression de *c-myc* et autres gènes cibles du complexe β -caténine/TCF4 dans une banque plus importante de spécimens de cancers colorectaux et de vérifier s'il y a corrélation avec la présence de mutations de KRAS, NRAS, BRAF et EGFR et ce, en fonction du statut d'APC. De manière intéressante, l'étude de Singh et collaborateurs a également rapporté

une expression plus élevée des gènes cibles de la voie Wnt/ β -caténine dans les tumeurs à la fois mutées pour *KRAS* et *APC* en comparaison aux tumeurs mutées seulement pour *APC* (Singh et al., 2012).

Récemment, plusieurs analyses par criblage de shRNA sur l'ensemble du génome humain ont permis d'identifier une panoplie de gènes essentiels à la prolifération et à la survie des cellules CRC mutées pour *KRAS* (Barbie et al., 2009; Luo et al., 2009; Scholl et al., 2009; Singh et al., 2009). En lien avec l'étude de Singh et collaborateurs, il sera également pertinent d'identifier les gènes effecteurs de la voie Wnt impliqués dans la dépendance des cellules cancéreuses à l'oncogène *KRAS* et d'y évaluer le rôle de la phosphorylation de LRP6 dans leur expression. Les données obtenues devraient être comparées à ceux de la base de données du Broad Institute (*Achille project*, <http://www.broadinstitute.org>) afin de permettre d'identifier de futures cibles pharmacologiques dans le traitement du cancer colorectal.

Précédemment, la signalisation Wnt découlant du récepteur LRP6 a principalement été décrite pour induire une stabilisation de la β -caténine associée à l'inactivation de la protéine Axine, une composante importante du complexe de dégradation de la β -caténine (He et al., 2004; Kim et al., 2013). Cependant, nous n'avons pas observé de stabilisation de la β -caténine dans nos modèles de transformation induite par *KRAS*^{G12V} et caMEK1, même si une augmentation de son activité transcriptionnelle est observée. De plus, l'inhibition pharmacologique de MEK1/2 dans les cellules cancéreuses DLD-1 et HT-29 n'altère pas l'expression de la β -caténine, même si celle-ci est relocalisée au cytoplasme et interagit moins avec TCF4. Ainsi, l'activité MEK/ERK exerce un certain contrôle sur l'activité et la localisation nucléaire de la β -caténine indépendamment des processus contrôlant sa stabilité. De façon similaire, il a déjà été démontré que l'inhibition des kinases JNK a pour conséquence de diminuer la localisation nucléaire ainsi que l'activité transcriptionnelle de la β -caténine dans les cellules stromales ST2 et ce, sans altérer sa stabilité (Wu et al., 2008). Cependant, l'inhibition pharmacologique de MEK1/2 n'affecte pas l'activité des kinases JNK dans nos lignées de cellules CRC (résultats préliminaires), laissant présager la présence d'un autre mécanisme. Une autre étude a également démontré la coopération entre

la protéine Dvl et c-jun sur l'activité et sur la formation nucléaire du complexe β -caténine/TCF4 et ce, indépendamment de l'accumulation ou de la stabilisation de la β -caténine (Gan et al., 2008). Dans son ensemble, ces résultats montrent qu'il est possible de stimuler l'activité transcriptionnelle de la β -caténine ainsi que sa localisation nucléaire sans affecter sa stabilité ou moduler les protéines associées au complexe de dégradation de la β -caténine. Plus spécifiquement, nos résultats suggèrent que la phosphorylation de LRP6 pourrait y être impliquée.

Plusieurs observations récentes suggèrent que la perte de fonction d'APC ne serait pas suffisante pour induire la localisation nucléaire de la β -caténine et que d'autres altérations génétiques subséquentes étaient probablement nécessaires. Par exemple, l'analyse par microscopie confocale de la β -caténine dans des polypes adénomateux et dans des adénocarcinomes humains montre que son accumulation nucléaire ne corrèle pas nécessairement avec le statut de mutation d'*APC* (Anderson et al., 2002). Plus récemment, l'étude de Phelps et collaborateurs a rapporté que les adénomes humains d'origine familiale (FAP) ne présentaient pas d'accumulation nucléaire de la β -caténine en comparaison aux carcinomes du même patient (Phelps et al., 2009). On peut ainsi émettre l'hypothèse que l'activité MEK découlant des mutations *KRAS* et *BRAF* pourrait être impliquée dans le contrôle de la localisation nucléaire de la β -caténine et ce, de manière indépendante à sa stabilisation cytoplasmique généralement associée à la mutation d'*APC*. Il serait intéressant d'évaluer l'existence de ce parallèle dans les tumeurs humaines, c'est-à-dire de corréler l'activité ERK1/2 avec la présence nucléaire de la β -caténine et ce, en fonction des mutations aux oncogènes *KRAS* et *BRAF* et du statut d'*APC*.

Dans les cellules CRC, nous avons cherché à comprendre les mécanismes moléculaires sous-jacents à la relocalisation cytoplasmique de la β -caténine ainsi que la réduction de son association avec TCF4 suite à l'inhibition de l'activité MEK1/2. Nous avons donc vérifié l'état de phosphorylation de la β -caténine sur certains résidus connus pour contrôler sa localisation subcellulaire, son interaction avec la E-cadhérine et autres caténines (Lilien et al., 2002; Mareel et Leroy, 2003). Aucune modulation des niveaux de phosphorylation de la β -caténine sur Y86, Y142, S552 et Y654 n'a été observée, de même qu'aucune

modification de son niveau d'interaction avec la E-cadhérine. Ceci n'exclut pas l'implication potentielle d'autres modifications post-traductionnelles dans le contrôle de sa localisation subcellulaire telles que la phosphorylation sur sérine 191 et sérine 605 (Wu et al., 2008), l'ubiquitination, l'acétylation et la glycosylation (Valenta et al., 2012). Une analyse par spectrométrie de masse permettrait potentiellement d'identifier la présence d'autres modifications post-traductionnelles de la β -caténine et/ou de TCF4 susceptibles de moduler leur interaction et/ou localisation.

Il a également été rapporté que l'expression de Snail1 et Snail2 dans les cellules DLD-1, promeut la formation du complexe β -caténine/TCF4 et augmente ainsi son activité transcriptionnelle (Medici et al., 2008). De même, l'étude de Stemmer et collaborateurs a démontré dans les lignées cancéreuses colorectales HCT116 et SW480 que Snail1 interagit directement avec β -caténine et qu'il augmente l'expression de ses gènes cibles (Stemmer et al., 2008). Nous avons démontré précédemment que l'inhibition de l'activité MEK1/2 par le U0126 réprime l'expression de Snail1 et Snail2 dans ces mêmes lignées CRC (Manuscrit 2). Ceci laisse suggérer la possibilité l'activité MEK/ERK puisse participer au contrôle de l'activité du complexe β -caténine/TCF4 par ce mécanisme. D'autres études seront nécessaires pour définir précisément l'implication de ce mécanisme (et autres) impliqué dans le contrôle, par l'activité MEK/ERK, de la localisation subcellulaire de la β -caténine ainsi que son niveau d'association avec TCF4.

Nous avons donc mis en évidence l'existence d'une interrelation entre les deux voies majeures de signalisation impliquées dans la prolifération des CEIs normales et cancéreuses en plus d'avoir identifié certains des mécanismes impliqués dans cette interaction. Précédemment, le croisement entre le modèle murin $APC^{Min/+}$ et celui possédant la mutation oncogénique de KRAS (Luo et al., 2009; Sansom et al., 2006; Haigis et al., 2008) ou de BRAF (Coffee et al., 2013) avait déjà démontré une synergie dans l'induction de la tumorigénèse intestinale. En outre, les auteurs ont noté une augmentation du nombre et de la taille des tumeurs formées, de même qu'une augmentation de leurs capacités invasives. Mentionnons également que l'inhibition pharmacologique de l'activité MEK chez la souris $APC^{Min/+}$ bloque l'apparition de la polypose intestinale (Lee et al., 2010), suggérant que

l'activité MEK1/2 est nécessaire au caractère tumorigénique induit par la perte de fonction d'*APC*. En sommes, ces études supportent l'existence, dans le développement d'adénomes colorectaux, d'une synergie entre les mutations des gènes *KRAS* et *APC*. Une meilleure compréhension des interrelations entre les deux voies de signalisation contrôlées par *KRAS* et *APC* permettra d'établir une stratégie thérapeutique ciblant ces points d'interconnexions afin de traiter efficacement les sous-types de cancers présentant la combinaison de ces mutations. De plus, ces analyses permettront d'identifier les possibles mécanismes de résistance aux thérapies ciblées visant l'une ou l'autre de ces voies de signalisation.

4 Régulation des isoformes de ERK1 par les formes oncogéniques de KRAS et de MEK1.

De manière intrigante, les cellules IEC-6 transformées de manière stable par les formes oncogéniques de *KRAS* et de *MEK1* présentent peu ou pas d'augmentation des niveaux de phosphorylation endogène d'ERK1/2 (Manuscrit 2 et 4). Une possible explication réside dans le fait que l'activité MEK de ces cellules est stimulée de façon constitutive et induit une rétroaction négative sur l'activité des kinases ERK1/2. Des études réalisées chez les fibroblastes de rongeurs ont précédemment démontré que l'expression de la forme active de *MEK1* peut induire un rétrocontrôle menant à l'inactivation des kinases endogènes MEK1/2 (Brunet et al., 1994), de même qu'une augmentation de l'expression des phosphatases DUSPs capables de déphosphoryler ERK1 et ERK2 (Brondello et al., 1997; Gopalbhai et Meloche, 1998; Pouysségur et al., 2002). Plusieurs études ont également rapporté une réduction de l'activité ERK1/2 suite à une stimulation par le sérum de cellules transformées par différents activateurs oncogéniques de la voie MAPK (Greulich et al., 1996; Greulich et Erickson, 1998; Gopalbhai et Meloche, 1998). Plus récemment, des études réalisées dans notre laboratoire ont démontré que les cellules IEC-6 transformées par *KRAS*^{G12V} ou *BRAF*^{V600E} expriment des niveaux élevés des phosphatases DUSP4 et DUSP6 (Cagnol et Rivard, 2013). Ceci pourrait donc expliquer l'absence d'augmentation des niveaux de phosphorylation de ERK1/2 dans nos modèles stables de transformation.

Néanmoins, une observation intéressante que nous avons effectuée est la détection, par deux anticorps dirigés contre les formes phosphorylées et actives des ERK1/2

(Thr202/Tyr204), d'une autre forme retardée en migration sur gel d'électrophorèse d'un poids moléculaire d'environ 46kDa. Notre laboratoire avait déjà observé cette forme dans les cellules IEC-6 et l'avait associée au variant d'épissage de ERK1 soit ERK1b (Boucher et al., 2004; Yung et al., 2000; 2001; Annexe III). Chez le rat, ERK1b est le produit de l'épissage alternatif du gène ERK1 et possède une insertion de 26 acides aminés en C-terminal dans le domaine CRS/CD. Ce domaine est impliqué dans l'interaction de ERK1 avec ses substrats et les phosphatases qui régulent son activité (Rubinfeld et al., 1999). De manière intéressante, nous avons observé que la forme phosphorylée d'ERK1b est retrouvée de façon prédominante dans les cellules transformées par KRAS^{G12V} et caMEK1 (Annexe IV). De façon surprenante, ERK1b semble être la seule isoforme des ERKs dont le niveau de phosphorylation est augmenté dans les cellules transformées. Une possible explication réside dans le fait qu'ERK1b a été montré comme étant moins sensible qu'ERK1 aux phosphatases (Yung et al., 2001), ce qui permettrait d'expliquer pourquoi nous détectons l'augmentation de sa phosphorylation (et non celle de ERK1 ou ERK2) dans nos modèles de transformation. Nous avons donc voulu évaluer la contribution spécifique de cette isoforme dans la transmission du signal oncogénique de Ras^{G12V} et caMEK1. Ainsi, nous avons généré un shARN capable de diminuer spécifiquement l'expression de ERK1b et ce, sans affecter l'expression de ERK1 ou ERK2. Tel que montré à l'annexe V et VI, la réduction des niveaux d'expression de ERK1b atténue de façon assez marquée le niveau de transformation associée à l'expression de Ras^{G12V} et caMEK1. On observe également que les cellules sous-exprimant ERK1b prolifèrent moins rapidement, forment moins de colonies en agar mou et présentent une morphologie plus épithéliale. Ces résultats suggèrent donc un rôle important de ce variant d'épissage de ERK1 dans le maintien de la transformation des cellules IEC-6 par les formes oncogéniques de KRAS et de MEK1.

Chez l'humain, l'homologue de l'isoforme ERK1b se nomme ERK1c et code pour une protéine de 42 kDa qui a été rapportée pour son implication dans la fragmentation de l'appareil de Golgi, une étape nécessaire à la progression de la mitose (Shaul et Seger, 2006). Fait intéressant à noter, bien qu'ERK1 soit également activée durant cette phase du cycle cellulaire, il ne peut compenser pour la perte d'ERK1c, suggérant ainsi qu'il possède des fonctions et possiblement des cibles qui lui sont spécifiques. Bien que dans la majorité

des cas l'activation de kinases oncogéniques est induite par l'apparition de mutations ou par surexpression, certaines études suggèrent qu'un contrôle aberrant de l'épissage alternatif peut aussi causer une dérégulation de leur activité et être impliqué dans la carcinogénèse (Druillenec et al., 2012). Nous avons donc évalué les variations de l'expression de ce variant d'épissage de ERK1 dans des spécimens de cancers colorectaux. Nos résultats montrent une augmentation de l'expression relative d'ERK1c, en comparaison à ERK1, dans pratiquement tous les tissus issus de cancers du côlon lorsque comparés avec leur tissu sain adjacent (Annexe VII). Le génotype de ces tumeurs n'était pas connu au moment de l'étude, les résultats ne permettent pas d'évaluer l'importance de l'activation oncogénique de KRAS/BRAF dans l'expression de l'isoforme ERK1c. Ce résultat suggère simplement que l'expression de ERK1c, en comparaison à l'expression de ERK1, est augmentée dans le tissu cancéreux en comparaison au tissu sain adjacent. Le rôle de cette isoforme devra faire l'objet d'études plus approfondies dans le contrôle de la transformation cellulaire ainsi qu'au niveau de la carcinogénèse colorectale. Il serait notamment important d'identifier si cette kinase alternative possède des substrats spécifiques différents de ERK1, comme l'étude de Shaul le suggère (Shaul et al., 2009). Ainsi, ERK1c ou ses substrats spécifiques pourraient être des cibles pharmacologiques de choix pour minimiser les effets systémiques liés à l'inhibition globale de l'activité de RAS, RAF, MEK1/2 ou ERK1/2.

5 L'utilisation de kinases MEKs et ERKs en tant des cibles pharmacologiques dans le traitement du cancer colorectal?

Étant donné le rôle central de la signalisation MEK/ERK dans le contrôle de la prolifération et la survie cellulaire, il n'est pas surprenant que le développement du cancer soit associé à de fréquentes altérations de ce sentier de signalisation. Puisque des mutations gains de fonction dans les gènes *KRAS*, *NRAS* et *BRAF* sont retrouvées dans plus de 60% des cancers colorectaux, les composantes en aval de ces oncogènes sont considérées comme des cibles attrayantes en oncologie. L'ensemble de la littérature scientifique supporte une implication importante de l'activation oncogénique de la voie RAS/BRAF/MEK/ERK dans la tumorigénèse colorectale et la formation de métastases. Plusieurs études ont d'ailleurs démontré que l'inhibition de l'activité de MEK1/2 réduit la croissance des cellules cancéreuses d'origine colorectale en culture (Voisin et al., 2008; Kress et al., 2010), leur

croissance en indépendance d'ancrage (Yeh et al., 2009) de même que leur capacité à former des tumeurs dans des modèles de xénogreffes (Sebolt-Leopold et al., 1999; Voisin et al., 2008; Lemieux et al., 2009). Des études pré-cliniques ont démontré que l'utilisation d'inhibiteurs très spécifique de MEK1/2 (PD0325901; Solit et al., 2006 et RDEA119/BAY 869766; Iverson et al., 2009) réduisait la croissance de xénogreffes issues de plusieurs lignées de cellules CRC en induisant l'arrêt du cycle cellulaire de même que l'apoptose. Ainsi, face au rôle évident de l'activité MEK/ERK dans l'effet oncogénique de *KRAS* et *BRAF*, plusieurs molécules inhibitrices de MEK1/2 ont été conçues et testées en essais cliniques chez l'humain (Frémin et Meloche, 2010; Friday et Adejei, 2008). Malgré le fort degré de spécificité et d'efficacité des inhibiteurs allostériques de MEK, les thérapies anticancéreuses basées sur l'utilisation de ces inhibiteurs n'ont pas encore démontré d'efficacité clinique convaincante (Frémin et Meloche, 2010). À ce jour, l'absence de molécules adéquates (problèmes de stabilité métabolique, pauvre biodisponibilité, toxicité) ne permet pas de répondre de façon claire quant à la réelle efficacité anti-tumorale de l'inhibition de MEK dans le cancer colorectal chez l'humain. De nouveaux inhibiteurs ayant potentiellement moins d'effets secondaires ont été développés et font l'objet d'études cliniques; ces derniers permettront, espérons-le, de répondre à cette question. Le RDEA119/BAY869766 a d'ailleurs terminé son étude clinique de phase I pour le traitement de patients atteints de divers types de cancer et a démontré des résultats intéressants sur une large gamme de tumeurs résistantes aux thérapies conventionnelles (Weekes et al., 2013). De plus, deux inhibiteurs de MEK (Trametinib et Dabrafenib) ont récemment reçu l'approbation de la FDA pour le traitement de mélanomes métastatiques (FDA.gov/drugs). Il ne serait pas surprenant que le potentiel de ces molécules ne soient éventuellement évalué pour le traitement du cancer colorectal.

Une stratégie thérapeutique basée sur l'utilisation de ces inhibiteurs devrait prendre en considération la dépendance des tumeurs à l'activité de MEK. En effet, il a été démontré que les cellules CRC présentant la mutation activatrice de BRAF, et non de KRAS, prédit mieux la sensibilité des cellules CRC en culture ou en xénogreffes aux inhibiteurs de MEK (Solit et al., 2006; Yeh et al., 2009). Un autre aspect important à noter est qu'au même titre que la chimiothérapie classique, la thérapie ciblée présente également des mécanismes de

résistance au traitement. Par exemple, il faut considérer la plasticité cellulaire ainsi que la redondance des voies de signalisation. Un cas typique est celui de l'inhibiteur de la forme oncogénique BRAF^{V600E}, le Vemurafenib, où son utilisation dans le traitement des mélanomes et des cancers colorectaux provoque l'apparition d'une résistance au traitement via l'hyperactivation de la voie RAS/C-RAF/MEK/ERK induite par une réactivation du récepteur à l'EGF (Prahallad et al., 2012; De Mello, 2012; Corcoran et al., 2012). Ainsi, ces études et d'autres (Flaherty et al., 2012; King et al., 2013; Wagle et al., 2013) suggèrent l'utilisation combinée des inhibiteurs de BRAF et des inhibiteurs de MEK, afin de contourner la mise en place des mécanismes de résistance. Un autre phénomène de résistance aux thérapies ciblant MEK1/2 est l'apparition de mutations de MEK1 qui induisent une insensibilité à l'inhibiteur, un évènement observé suite au traitement de mélanomes avec l'AZD6244 (Emery et al., 2009). Les résistances aux thérapies peuvent également s'expliquer par l'interconnexion des voies de signalisation, l'une prenant le relais de l'autre lors du blocage thérapeutique de la première. Ainsi, il faut se rappeler que KRAS active également la voie PI3K/Akt/mTOR, une voie aussi capable d'activer la prolifération cellulaire et la survie des cellules tumorales (Guertin et Sabatini, 2007). La double inhibition de la voie des MAP kinases et de la voie de la PI3-kinase, par un inhibiteur de mTOR, pourrait s'avérer être un choix judicieux pour le traitement du cancer (Wee et al., 2009; Chang et al., 2009).

6 Conclusions et perspectives

L'ensemble de mon projet de recherche repose sur l'hypothèse que la signalisation MEK/ERK est impliquée dans l'initiation et la progression du cancer colorectal. Les résultats découlant de mes travaux de recherche ont permis d'identifier certains des mécanismes moléculaires par lesquels l'activation oncogénique du sentier MEK/ERK contrôle la tumorigénèse intestinale. Nous avons caractérisé l'implication de l'activité MEK/ERK sur plusieurs processus cellulaires associés à l'initiation et à la progression de la tumorigénèse intestinale, de même que son rôle dans le contrôle du statut prolifération/différenciation des CEIs.

En premier lieu, nous avons analysé le rôle exact et la nécessité de l'inhibition de l'activité MEK/ERK lors de l'induction de la différenciation des CEIs. Nos résultats démontrent qu'un maintien de l'activité MEK/ERK bloque le processus de différenciation entérocytaire et conserve les CEIs dans un état prolifératif et indifférencié. Cette inhibition de la différenciation a été associée à la phosphorylation inactivatrice de Cdx2/3 sur la sérine-60 qui réduit son activité transcriptionnelle et par conséquent altère le processus de différenciation. En effet, la réduction de l'activité de Cdx2/3 se traduit par une réduction de l'expression des marqueurs de différenciation cellulaire; on observe en parallèle une désorganisation des jonctions cellulaires probablement responsable de l'inhibition de la différenciation morphologique.

L'inhibition de la différenciation, donc le maintien des cellules épithéliales dans un état prolifératif, est un des processus impliqués dans la tumorigénèse (Evan et Vousden, 2001). Étant donné la fonction suspectée de suppresseur de tumeurs de Cdx2, la régulation de son activité par la signalisation oncogénique de la voie KRAS/MAP kinase pourrait être impliquée dans la carcinogénèse colorectale. D'ailleurs, nous avons observé un niveau élevé de phosphorylation de Cdx2 sur la sérine-60 dans certaines lignées CRC humaines. Ainsi, nous spéculons que l'activité oncogénique du sentier MEK/ERK induit cette phosphorylation qui participe à la tumorigénèse colorectale. Cette hypothèse devrait faire l'objet d'analyses plus approfondies, de même qu'évaluer si ce parallèle existe dans les tumeurs humaines et ce, en fonction du niveau de différenciation du tissu. De plus, il serait

intéressant d'évaluer l'impact de l'expression du mutant non phosphorylable de Cdx2 (Cdx2/S60A) sur le niveau de différenciation entérocytaire, le rythme de prolifération ainsi que sur le potentiel tumorigénique des différentes lignées cancéreuses colorectale. À notre connaissance, aucune étude ne s'est intéressée à l'analyse de l'activité de Cdx2 plutôt qu'à son expression dans le cancer du côlon.

Deuxièmement, nous avons démontré que l'expression de la forme active de MEK1, dans les CEIs, est suffisante pour induire une transformation cellulaire associée à une transition épithélio-mésenchymateuse. Nos résultats démontrent que ce changement phénotypique est associé à l'acquisition d'une capacité à former des tumeurs invasives et métastatiques *in vivo*. L'expression MEK-dépendante des facteurs de transcription Snail1 et Snail2, régule à la baisse l'expression des protéines de jonctions telles que la E-cadhérine. La perte des contacts cellules-cellules augmente la motilité des cellules épithéliales transformées et par conséquent, leur capacité de migration et d'invasion. Notre étude est la première à identifier l'implication des cascades Fra-1/Snail2 et EGR-1/Snail1 comme les mécanismes régulant la répression transcriptionnelle de la E-cadhérine des CEIs médiée par l'activité MEK/ERK. De plus, l'activation aberrante de la voie Wnt/ β -caténine, également dérégulée par caMEK1 (Manuscrit 4), stimule l'expression de Fra-1; suggérant un nouveau un point de convergence entre ces deux voies de signalisation. Il serait important d'analyser la contribution relative de ces effecteurs dans l'induction et le maintien de l'EMT induite par l'activité oncogénique de la voie KRAS/MAP kinase. Il serait également intéressant de confirmer cette hypothèse et de valider nos observations *in vivo* dans l'épithélium intestinal de souris exprimant la forme oncogénique de KRAS ou BRAF de même que sur un large éventail de lignées CRC possédant les mêmes mutations.

Troisièmement, nos travaux ont démontré que l'activité constitutive du sentier MEK/ERK induit l'expression et la sécrétion de plusieurs facteurs impliqués dans la dégradation de la matrice extracellulaire, une étape nécessaire à la formation de métastases. Nous avons identifié les métalloprotéinases MMP2/9 comme cibles de l'activité RAS/MAP kinase. Notre étude a également permis d'identifier d'autres modulateurs de l'activité protéolytique extracellulaire induits par l'activité oncogénique du sentier MEK/ERK, notamment

l'inhibiteur de sérine protéase serpineE2. Nous avons caractérisé son implication dans l'invasion tumorale des cellules cancéreuses, notamment son rôle dans l'adhésion, la migration, l'invasion, la croissance en indépendance d'ancrage ainsi que le potentiel tumoral. Bien que récent, le rôle de la serpineE2 dans la tumorigénèse est supporté par un nombre croissant d'études, tant au niveau de l'activation du complexe uPA/uPAR que par son implication dans la protéolytique extracellulaire associée à l'invasion tumorale. Notre étude est la première à démontrer que la serpineE2 est une cible de l'activité MEK/ERK et qu'elle contribue au maintien des propriétés tumorales des cellules transformées et des cellules CRC humaines. En fonction des résultats préliminaires obtenus, il serait intéressant d'analyser l'implication de la serpineE2 dans l'angiogenèse tumorale afin de mieux comprendre son implication dans la néo-vascularisation induite par la voie oncogénique MEK/ERK. Étant donné que la serpineE2 est une protéine sécrétée et que son expression est fortement augmentée dans les tissus cancéreux, il serait intéressant d'évaluer aussi son utilisation en tant que biomarqueur sanguin pour la détection et la progression du cancer colorectal. L'étude de biobanques de patients (sang + tissus) ainsi que des modèles de xénogreffes de cellules CRC permettrait de vérifier cette hypothèse.

En dernier lieu, nous avons démontré la contribution du sentier Wnt/ β -caténine dans la tumorigénèse induite par l'activité oncogénique de la voie RAS/MAP kinase. Bien que la littérature supporte l'existence d'une interaction entre ces deux principales voies de signalisation menant à la tumorigénèse colorectale, peu d'études se sont intéressées à évaluer leurs interactions dans la transformation des CEIs et dans le maintien des propriétés tumorales des cellules CRC établies. Nous avons démontré que l'activation oncogénique du sentier MEK/ERK augmente la phosphorylation du co-récepteur des Wnts LRP6, augmentant l'activité du complexe β -caténine/TCF4 et l'expression de ses gènes cibles. Nous pensons que la phosphorylation de LRP6 favorise sa signalisation en aval, menant à une localisation nucléaire de la β -caténine et à la hausse de son activité transcriptionnelle. Ce mécanisme contribuerait au potentiel tumorigénique des cellules épithéliales en contrôlant leur prolifération, leur croissance en indépendance d'ancrage, leur migration ainsi que leur potentiel invasif et tumoral *in vivo*. Il serait également intéressant de confirmer nos observations *in vivo* dans l'épithélium intestinal des souris exprimant la

forme oncogénique de KRAS ou BRAF ainsi que dans des modèles de xénogreffes de cellules CRC. En parallèle, il serait pertinent d'évaluer l'impact de l'inhibition de la voie Wnt, par l'utilisation de DKK1 ou d'autres inhibiteurs pharmacologiques (IGC-001), sur la tumorigénèse qui en résulte. De plus, il serait nécessaire d'identifier les gènes cibles du complexe β -caténine/TCF4 nécessaires à la tumorigénèse induite par la voie RAS/MAP kinase, ce qui permettrait de proposer de nouvelles cibles pertinentes à utiliser pour le traitement du cancer colorectal. Une meilleure connaissance des interactions moléculaires entre les voies de signalisation majeures impliquées dans la carcinogénèse colorectale est nécessaire pour bien comprendre la pathologie ainsi que l'impact des ces différentes altérations génétiques.

La phosphorylation de LRP6 par l'activité oncogénique de MEK ouvre la voie à plusieurs questions concernant l'impact de l'activité ERK1/2 dans le contrôle des autres voies de signalisation impliquant le co-récepteur LRP6. En plus de réguler la voie Wnt, ce dernier contribue également à la signalisation des récepteurs du TGF β et du PDGF (Ren et al., 2013). Ces deux voies de signalisation étant aussi impliquées dans le développement du cancer du côlon (Bellam et Pasche, 2010; Nakamura et al., 2008), il serait donc pertinent de déterminer leur contribution dans la transformation induite par l'activité oncogénique de KRAS/MAP kinase. Précédemment, l'étude de Lee et collaborateurs a démontré une augmentation de l'activité ERK1/2 dans les polypes colorectaux des souris *APC^{min/+}* (Lee et al., 2004) et plus récemment que l'inhibition de MEK1/2, par l'utilisation du CI-1040, bloque l'apparition des polypes intestinaux (Lee et al., 2010). Ces observations suggèrent une forte contribution de l'activité ERK1/2 dans la tumorigénèse induite par la perte de fonction d'*APC*. Ainsi, il serait intéressant d'évaluer le niveau de phosphorylation de LRP6 dans ces modèles ainsi que l'activité des autres voies de signalisation découlant de LRP6.

Une autre retombée de mes travaux de recherche concerne les variants d'épissages de ERK1 : ERK1b et ERK1c. Nos résultats suggèrent qu'ERK1b est la principale isoforme des ERKs modulée dans les cellules IEC-6 transformées par les formes oncogéniques de KRAS, BRAF et MEK1. L'utilisation d'un shRNA dirigé spécifiquement contre ERK1b supporte un rôle pour ce variant dans la transmission du signal oncogénique, de même que

dans la transformation cellulaire et l'EMT. Chez l'humain, on retrouve une augmentation de l'expression relative d'ERK1c, en comparaison à ERK1, dans une majorité de tumeurs colorectales suggérant un contrôle aberrant de l'épissage alternatif d'ERK1 durant le développement du cancer. Le rôle de ces isoformes dans le contrôle de la tumorigénèse colorectale devrait être approfondi, notamment en identifiant leurs cibles spécifiques. Ces dernières pourraient s'avérer être des cibles pharmacologiques de choix pour minimiser les effets systémiques liés à l'inhibition globale de l'activité de MEK1/2.

En résumé, mes travaux de recherche nous permettent de mieux comprendre les mécanismes moléculaires par lesquels l'activité oncogénique du sentier MEK/ERK contrôle la tumorigénèse intestinale. Nous savons maintenant que l'activation constitutive de la voie MEK/ERK est suffisante pour bloquer la différenciation et induire *in vivo* la tumorigénèse associée à l'induction d'une transition épithélium-mésenchyme. Cette EMT confère aux cellules épithéliales intestinales des capacités invasives et métastatiques associées à la sécrétion de protéases et d'inhibiteurs de protéases extracellulaires. De plus, nous savons maintenant que la transformation cellulaire dépendante de MEK stimule la voie signalisation WNT/ β -caténine et que cette dernière participe à la transformation et à la tumorigénèse des CEIs. L'avancement des connaissances sur les voies de signalisation associées à la carcinogénèse colorectale telles que la voie KRAS/ERK MAP kinase est nécessaire pour trouver des stratégies de traitements plus efficaces et remporter la lutte contre le cancer colorectal.

Liste des références

- (1) Adams JC, Kureishy N, Taylor AL. A role for syndecan-1 in coupling fascin spike formation by thrombospondin-1.. *J Cell Biol* 2001;152: 1169-82.
- (2) Adeyinka A, Nui Y, Cherlet T, Snell L, Watson PH, Murphy LC. Activated mitogen-activated protein kinase expression during human breast tumorigenesis and breast cancer progression.. *Clin Cancer Res* 2002;8: 1747-53.
- (3) Adjei AA, Cohen RB, Franklin W, Morris C, Wilson D, Molina JR, et al. Phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of the oral, small-molecule mitogen-activated protein kinase kinase 1/2 inhibitor AZD6244 (ARRY-142886) in patients with advanced cancers.. *J Clin Oncol* 2008;26: 2139-46.
- (4) Agrawal D, Chen T, Irby R, Quackenbush J, Chambers AF, Szabo M, et al. Osteopontin identified as colon cancer tumor progression marker.. *C R Biol* 2003;326: 1041-3.
- (5) Agrawal D, Chen T, Irby R, Quackenbush J, Chambers AF, Szabo M, et al. Osteopontin identified as lead marker of colon cancer progression, using pooled sample expression profiling.. *J Natl Cancer Inst* 2002;94: 513-21.
- (6) Akhtar N, Dickerson EB, Auerbach R. The sponge/Matrigel angiogenesis assay.. *Angiogenesis* 2002;5: 75-80.
- (7) Aliaga JC, Deschenes C, Beaulieu JF, Calvo EL, Rivard N. Requirement of the MAP kinase cascade for cell cycle progression and differentiation of human intestinal cells. *Am J Physiol* 1999;277: G631-41.
- (8) Amos-Landgraf JM, Kwong LN, Kendzierski CM, Reichelderfer M, Torrealba J, Weichert J, et al. A target-selected Apc-mutant rat kindred enhances the modeling of familial human colon cancer.. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104: 4036-41.
- (9) Anderson CB, Neufeld KL, White RL. Subcellular distribution of Wnt pathway proteins in normal and neoplastic colon.. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99: 8683-8.
- (10) Andreasen PA, Kjoller L, Christensen L, Duffy MJ. The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: a review.. *Int J Cancer* 1997;72: 1-22.
- (11) Andreolas C, Kalogeropoulou M, Voulgari A, Pintzas A. Fra-1 regulates vimentin during Ha-RAS-induced epithelial mesenchymal transition in human colon carcinoma cells.. *Int J Cancer* 2008;122: 1745-56.
- (12) Andreu P, Colnot S, Godard C, Gad S, Chafey P, Niwa-Kawakita M, et al. Crypt-restricted proliferation and commitment to the Paneth cell lineage following Apc loss in the mouse intestine.. *Development* 2005;132: 1443-51.

- (13) Aoki K, Taketo MM. Adenomatous polyposis coli (APC): a multi-functional tumor suppressor gene.. *J Cell Sci* 2007;120: 3327-35.
- (14) Aoki K, Tamai Y, Horiike S, Oshima M, Taketo MM. Colonic polyposis caused by mTOR-mediated chromosomal instability in *Apc⁺/Delta716 Cdx2^{+/-}* compound mutant mice. *Nat Genet* 2003;35: 323-330.
- (15) Arbiser JL, Moses MA, Fernandez CA, Ghiso N, Cao Y, Klauber N, et al. Oncogenic H-ras stimulates tumor angiogenesis by two distinct pathways.. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94: 861-6.
- (16) Augeron C, Laboisie CL. Emergence of permanently differentiated cell clones in a human colonic cancer cell line in culture after treatment with sodium butyrate.. *Cancer Res* 1984;44: 3961-9.
- (17) Bach SP, Renehan AG, Potten CS. Stem cells: the intestinal stem cell as a paradigm. *Carcinogenesis* 2000;21: 469-476.
- (18) Bafico A, Liu G, Yaniv A, Gazit A, Aaronson SA. Novel mechanism of Wnt signalling inhibition mediated by Dickkopf-1 interaction with LRP6/Arrow.. *Nat Cell Biol* 2001;3: 683-6.
- (19) Bagui TK, Jackson RJ, Agrawal D, Pledger WJ. Analysis of cyclin D3-cdk4 complexes in fibroblasts expressing and lacking p27(kip1) and p21(cip1).. *Mol Cell Biol* 2000;20: 8748-57.
- (20) Bajou K, Devy L, Masson V, Albert V, Franken F, Noel A, et al. Role of plasminogen activator inhibitor type 1 in tumor angiogenesis]. *Therapie* 2001;56: 465-72.
- (21) Bajou K, Noel A, Gerard RD, Masson V, Brunner N, Holst-Hansen C, et al. Absence of host plasminogen activator inhibitor 1 prevents cancer invasion and vascularization.. *Nat Med* 1998;4: 923-8.
- (22) Bajou K, Peng H, Laug WE, Maillard C, Noel A, Foidart JM, et al. Plasminogen activator inhibitor-1 protects endothelial cells from FasL-mediated apoptosis.. *Cancer Cell* 2008;14: 324-34.
- (23) Baker EA, Bergin FG, Leaper DJ. Plasminogen activator system, vascular endothelial growth factor, and colorectal cancer progression.. *Mol Pathol* 2000;53: 307-12.
- (24) Baker JB, Low DA, Simmer RL, Cunningham DD. Protease-nexin: a cellular component that links thrombin and plasminogen activator and mediates their binding to cells.. *Cell* 1980;21: 37-45.
- (25) Baliga BS, Borowitz SM, Barnard JA. Effects of EGF and PMA on the growth and proliferation of IEC-6 cells.. *Biochem Int* 1989;19: 1045-56.
- (26) Balmanno K, Cook SJ. Sustained MAP kinase activation is required for the expression of cyclin D1, p21Cip1 and a subset of AP-1 proteins in CCL39 cells.. *Oncogene* 1999;18: 3085-97.
- (27) Barbera MJ, Puig I, Dominguez D, Julien-Grille S, Guaita-Esteruelas S, Peiro S, et al. Regulation of Snail transcription during epithelial to mesenchymal transition of tumor cells.. *Oncogene* 2004;23: 7345-54.

- (28) Barbie DA, Tamayo P, Boehm JS, Kim SY, Moody SE, Dunn IF, et al. Systematic RNA interference reveals that oncogenic KRAS-driven cancers require TBK1.. *Nature* 2009;462: 108-12.
- (29) Bardwell L, Thorner J. A conserved motif at the amino termini of MEKs might mediate high-affinity interaction with the cognate MAPKs.. *Trends Biochem Sci* 1996;21: 373-4.
- (30) Baron-Delage S, Mahraoui L, Cadoret A, Veissiere D, Taillemite JL, Chastre E, et al. Deregulation of hexose transporter expression in Caco-2 cells by ras and polyoma middle T oncogenes. *Am J Physiol* 1996;270: G314-23.
- (31) Bartek J, Lukas J. Are all cancer genes equal? *Nature* 2001;411: 1001-1002.
- (32) Bates RC, Mercurio AM. The epithelial-mesenchymal transition (EMT) and colorectal cancer progression. *Cancer Biol Ther* 2005;4: 365-370.
- (33) Batlle E, Sancho E, Franci C, Dominguez D, Monfar M, Baulida J, et al. The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells.. *Nat Cell Biol* 2000;2: 84-9.
- (34) Beck F, Erler T, Russell A, James R. Expression of Cdx-2 in the mouse embryo and placenta: possible role in patterning of the extra-embryonic membranes.. *Dev Dyn* 1995;204: 219-27.
- (35) Behrens J, von Kries JP, Kuhl M, Bruhn L, Wedlich D, Grosschedl R, et al. Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1.. *Nature* 1996;382: 638-42.
- (36) Behrens J, Birchmeier W, Goodman SL, Imhof BA. Dissociation of Madin-Darby canine kidney epithelial cells by the monoclonal antibody anti-arc-1: mechanistic aspects and identification of the antigen as a component related to uvomorulin. *J Cell Biol* 1985;101: 1307-1315.
- (37) Bellam N, Pasche B. Tgf-beta signaling alterations and colon cancer.. *Cancer Treat Res* 2010;155: 85-103.
- (38) Bennecke M, Kriegl L, Bajbouj M, Retzlaff K, Robine S, Jung A, et al. Ink4a/Arf and oncogene-induced senescence prevent tumor progression during alternative colorectal tumorigenesis.. *Cancer Cell* 2010;18: 135-46.
- (39) Bermudez O, Pages G, Gimond C. The dual-specificity MAP kinase phosphatases: critical roles in development and cancer.. *Am J Physiol Cell Physiol* 2010;299: C189-202.
- (40) Berx G, Raspe E, Christofori G, Thiery JP, Sleeman JP. Pre-EMTing metastasis? Recapitulation of morphogenetic processes in cancer. *Clin Exp Metastasis* 2007;24: 587-597.
- (41) Blaker H, Scholten M, Sutter C, Otto HF, Penzel R. Somatic mutations in familial adenomatous polyps. Nuclear translocation of beta-catenin requires more than biallelic APC inactivation. *Am J Clin Pathol* 2003;120: 418-423.
- (42) Blancher C, Moore JW, Robertson N, Harris AL. Effects of ras and von Hippel-Lindau (VHL) gene mutations on hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha, HIF-2alpha, and vascular endothelial

growth factor expression and their regulation by the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signaling pathway.. *Cancer Res* 2001;61: 7349-55.

(43) Bogoyevitch MA, Court NW. Counting on mitogen-activated protein kinases--ERKs 3, 4, 5, 6, 7 and 8.. *Cell Signal* 2004;16: 1345-54.

(44) Bogoyevitch MA, Kobe B. Uses for JNK: the many and varied substrates of the c-Jun N-terminal kinases.. *Microbiol Mol Biol Rev* 2006;70: 1061-95.

(45) Bonhomme C, Duluc I, Martin E, Chawengsaksophak K, Chenard MP, Kedinger M, et al. The Cdx2 homeobox gene has a tumour suppressor function in the distal colon in addition to a homeotic role during gut development. *Gut* 2003;52: 1465-1471.

(46) Boudreau F, Rings EH, van Wering HM, Kim RK, Swain GP, Krasinski SD, et al. Hepatocyte nuclear factor-1 alpha, GATA-4, and caudal related homeodomain protein Cdx2 interact functionally to modulate intestinal gene transcription. Implication for the developmental regulation of the sucrase-isomaltase gene.. *J Biol Chem* 2002;277: 31909-17.

(47) Boulanger J, Vezina A, Mongrain S, Boudreau F, Perreault N, Auclair BA, et al. Cdk2-dependent phosphorylation of homeobox transcription factor CDX2 regulates its nuclear translocation and proteasome-mediated degradation in human intestinal epithelial cells. *J Biol Chem* 2005;280: 18095-18107.

(48) Boulton TG, Yancopoulos GD, Gregory JS, Slaughter C, Moomaw C, Hsu J, et al. An insulin-stimulated protein kinase similar to yeast kinases involved in cell cycle control.. *Science* 1990;249: 64-7.

(49) Bouton MC, Boulaftali Y, Richard B, Arocas V, Michel JB, Jandrot-Perrus M. Emerging role of serpinE2/protease nexin-1 in hemostasis and vascular biology.. *Blood* 2012;119: 2452-7.

(50) Bouton MC, Venisse L, Richard B, Pouzet C, Arocas V, Jandrot-Perrus M. Protease nexin-1 interacts with thrombomodulin and modulates its anticoagulant effect.. *Circ Res* 2007;100: 1174-81.

(51) Bowen KA, Doan HQ, Zhou BP, Wang Q, Zhou Y, Rychahou PG, et al. PTEN loss induces epithelial--mesenchymal transition in human colon cancer cells.. *Anticancer Res* 2009;29: 4439-49.

(52) Brabletz T, Jung A, Dag S, Hlubek F, Kirchner T. Beta-Catenin Regulates the Expression of the Matrix Metalloproteinase-7 in Human Colorectal Cancer.. *Am J Pathol* 1999;155: 1033-8.

(53) Brondello JM, Brunet A, Pouyssegur J, McKenzie FR. The dual specificity mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 and -2 are induced by the p42/p44MAPK cascade.. *J Biol Chem* 1997;272: 1368-76.

(54) Brunet A, Pages G, Pouyssegur J. Growth factor-stimulated MAP kinase induces rapid retrophosphorylation and inhibition of MAP kinase kinase (MEK1).. *FEBS Lett* 1994;346: 299-303.

- (55) Buchholz M, Biebl A, Neesse A, Wagner M, Iwamura T, Leder G, et al. SERPINE2 (protease nexin I) promotes extracellular matrix production and local invasion of pancreatic tumors in vivo.. *Cancer Res* 2003;63: 4945-51.
- (56) Cagnol S, Rivard N. Oncogenic KRAS and BRAF activation of the MEK/ERK signaling pathway promotes expression of dual-specificity phosphatase 4 (DUSP4/MKP2) resulting in nuclear ERK1/2 inhibition. *Oncogene* 2013;32: 564-576.
- (57) Candia BJ, Hines WC, Heaphy CM, Griffith JK, Orlando RA. Protease nexin-1 expression is altered in human breast cancer.. *Cancer Cell Int* 2006;6: 16.
- (58) Cantley LC. The phosphoinositide 3-kinase pathway.. *Science* 2002;296: 1655-7.
- (59) Cargnello M, Roux PP. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases.. *Microbiol Mol Biol Rev* 2011;75: 50-83.
- (60) Carlson SM, Chouinard CR, Labadorf A, Lam CJ, Schmelzle K, Fraenkel E, et al. Large-scale discovery of ERK2 substrates identifies ERK-mediated transcriptional regulation by ETV3.. *Sci Signal* 2011;4: rs11.
- (61) Carragher LA, Snell KR, Giblett SM, Aldridge VS, Patel B, Cook SJ, et al. V600EBraf induces gastrointestinal crypt senescence and promotes tumour progression through enhanced CpG methylation of p16INK4a.. *EMBO Mol Med* 2010;2: 458-71.
- (62) Carrasco D, Bravo R. Expression of the nontransmembrane tyrosine phosphatase gene *erp* during mouse organogenesis. *Cell Growth Differ* 1993;4: 849-859.
- (63) Caunt CJ, Keyse SM. Dual-specificity MAP kinase phosphatases (MKPs): shaping the outcome of MAP kinase signalling.. *FEBS J* 2013;280: 489-504.
- (64) Celano P, Berchtold CM, Mabry M, Carroll M, Sidransky D, Casero RA J, et al. Induction of markers of normal differentiation in human colon carcinoma cells by the v-rasH oncogene.. *Cell Growth Differ* 1993;4: 341-7.
- (65) Chang Q, Chapman MS, Miner JN, Hedley DW. Antitumour activity of a potent MEK inhibitor RDEA119/BAY 869766 combined with rapamycin in human orthotopic primary pancreatic cancer xenografts.. *BMC Cancer* 2010;10: 515-2407-10-515.
- (66) Chang Q, Chen E, Hedley DW. Effects of combined inhibition of MEK and mTOR on downstream signaling and tumor growth in pancreatic cancer xenograft models.. *Cancer Biol Ther* 2009;8: 1893-901.
- (67) Charest DL, Mordret G, Harder KW, Jirik F, Pelech SL. Molecular cloning, expression, and characterization of the human mitogen-activated protein kinase p44erk1.. *Mol Cell Biol* 1993;13: 4679-90.

- (68) Chen J. Is Src the key to understanding metastasis and developing new treatments for colon cancer?. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2008;5: 306-7.
- (69) Chen XF, Zhang HJ, Wang HB, Zhu J, Zhou WY, Zhang H, et al. Transforming growth factor-beta1 induces epithelial-to-mesenchymal transition in human lung cancer cells via PI3K/Akt and MEK/Erk1/2 signaling pathways.. *Mol Biol Rep* 2012;39: 3549-56.
- (70) Chia IV, Costantini F. Mouse axin and axin2/conductin proteins are functionally equivalent in vivo. *Mol Cell Biol* 2005;25: 4371-4376.
- (71) Chiba H, Osanai M, Murata M, Kojima T, Sawada N. Transmembrane proteins of tight junctions.. *Biochim Biophys Acta* 2008;1778: 588-600.
- (72) Chiu T, Santiskulvong C, Rozengurt E. ANG II stimulates PKC-dependent ERK activation, DNA synthesis, and cell division in intestinal epithelial cells.. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003;285: G1-11.
- (73) Chiu T, Wu SS, Santiskulvong C, Tangkijvanich P, Yee HF,Jr, Rozengurt E. Vasopressin-mediated mitogenic signaling in intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002;282: C434-50.
- (74) Clevers H. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell* 2006;127: 469-480.
- (75) Coats S, Flanagan WM, Nourse J, Roberts JM. Requirement of p27Kip1 for restriction point control of the fibroblast cell cycle.. *Science* 1996;272: 877-80.
- (76) Coffee EM, Faber AC, Roper J, Sinnamon MJ, Goel G, Keung L, et al. Concomitant BRAF and PI3K/mTOR blockade is required for effective treatment of BRAF(V600E) colorectal cancer.. *Clin Cancer Res* 2013;19: 2688-98.
- (77) Comijn J, Berx G, Vermassen P, Verschueren K, van Grunsven L, Bruyneel E, et al. The two-handed E box binding zinc finger protein SIP1 downregulates E-cadherin and induces invasion. *Mol Cell* 2001;7: 1267-1278.
- (78) Connell-Crowley L, Harper JW, Goodrich DW. Cyclin D1/Cdk4 regulates retinoblastoma protein-mediated cell cycle arrest by site-specific phosphorylation. *Mol Biol Cell* 1997;8: 287-301.
- (79) Cook SJ, Aziz N, McMahon M. The repertoire of fos and jun proteins expressed during the G1 phase of the cell cycle is determined by the duration of mitogen-activated protein kinase activation.. *Mol Cell Biol* 1999;19: 330-41.
- (80) Corcoran RB, Ebi H, Turke AB, Coffee EM, Nishino M, Cogdill AP, et al. EGFR-mediated reactivation of MAPK signaling contributes to insensitivity of BRAF mutant colorectal cancers to RAF inhibition with vemurafenib.. *Cancer Discov* 2012;2: 227-35.
- (81) Coutts AS, Murphy LC. Elevated mitogen-activated protein kinase activity in estrogen-nonresponsive human breast cancer cells.. *Cancer Res* 1998;58: 4071-4.

- (82) Cowan KJ, Storey KB. Mitogen-activated protein kinases: new signaling pathways functioning in cellular responses to environmental stress.. *J Exp Biol* 2003;206: 1107-15.
- (83) Davies M, Robinson M, Smith E, Huntley S, Prime S, Paterson I. Induction of an epithelial to mesenchymal transition in human immortal and malignant keratinocytes by TGF-beta1 involves MAPK, Smad and AP-1 signalling pathways.. *J Cell Biochem* 2005;95: 918-31.
- (84) De Craene B, Berx G. Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression.. *Nat Rev Cancer* 2013;13: 97-110.
- (85) De Mello RA. Metastatic melanoma and vemurafenib: novel approaches.. *Rare Tumors* 2012;4: e31.
- (86) Denicourt C, Dowdy SF. Cip/Kip proteins: more than just CDKs inhibitors.. *Genes Dev* 2004;18: 851-5.
- (87) Deschenes C, Alvarez L, Lizotte ME, Vezina A, Rivard N. The nucleocytoplasmic shuttling of E2F4 is involved in the regulation of human intestinal epithelial cell proliferation and differentiation.. *J Cell Physiol* 2004;199: 262-73.
- (88) Dhanasekaran DN, Kashef K, Lee CM, Xu H, Reddy EP. Scaffold proteins of MAP-kinase modules.. *Oncogene* 2007;26: 3185-202.
- (89) Dionne S, D'Agata ID, Ruummele FM, Levy E, St-Louis J, Srivastava AK, et al. Tyrosine kinase and MAPK inhibition of TNF-alpha- and EGF-stimulated IEC-6 cell growth.. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;242: 146-50.
- (90) Dreher MR, Liu W, Michelich CR, Dewhirst MW, Yuan F, Chilkoti A. Tumor vascular permeability, accumulation, and penetration of macromolecular drug carriers.. *J Natl Cancer Inst* 2006;98: 335-44.
- (91) Druillennec S, Dorard C, Eychene A. Alternative splicing in oncogenic kinases: from physiological functions to cancer.. *J Nucleic Acids* 2012;2012: 639062.
- (92) Duhamel S, Hebert J, Gaboury L, Bouchard A, Simon R, Sauter G, et al. Sef downregulation by Ras causes MEK1/2 to become aberrantly nuclear localized leading to polyploidy and neoplastic transformation.. *Cancer Res* 2012;72: 626-35.
- (93) Ebisuya M, Kondoh K, Nishida E. The duration, magnitude and compartmentalization of ERK MAP kinase activity: mechanisms for providing signaling specificity.. *J Cell Sci* 2005;118: 2997-3002.
- (94) Eggstein S, Franke M, Kutschka I, Manthey G, von Specht BU, Ruf G, et al. Expression and activity of mitogen activated protein kinases in human colorectal carcinoma. *Gut* 1999;44: 834-838.
- (95) Eisinger AL, Prescott SM, Jones DA, Stafforini DM. The role of cyclooxygenase-2 and prostaglandins in colon cancer.. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2007;82: 147-54.

- (96) Emery CM, Vijayendran KG, Zipser MC, Sawyer AM, Niu L, Kim JJ, et al. MEK1 mutations confer resistance to MEK and B-RAF inhibition.. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106: 20411-6.
- (97) Enns A, Korb T, Schluter K, Gassmann P, Spiegel HU, Senninger N, et al. Alphavbeta5-integrins mediate early steps of metastasis formation.. *Eur J Cancer* 2005;41: 1065-72.
- (98) Evan GI, Vousden KH. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer.. *Nature* 2001;411: 342-8.
- (99) Fagotto F, Gluck U, Gumbiner BM. Nuclear localization signal-independent and importin/karyopherin-independent nuclear import of beta-catenin.. *Curr Biol* 1998;8: 181-90.
- (100) Fahraeus R, Lain S, Ball KL, Lane DP. Characterization of the cyclin-dependent kinase inhibitory domain of the INK4 family as a model for a synthetic tumour suppressor molecule. *Oncogene* 1998;16: 587-596.
- (101) Falcioni R, Sacchi A, Resau J, Kennel SJ. Monoclonal antibody to human carcinoma-associated protein complex: quantitation in normal and tumor tissue.. *Cancer Res* 1988;48: 816-21.
- (102) Fang R, Santiago NA, Olds LC, Sibley E. The homeodomain protein Cdx2 regulates lactase gene promoter activity during enterocyte differentiation.. *Gastroenterology* 2000;118: 115-27.
- (103) Faux MC, Ross JL, Meeker C, Johns T, Ji H, Simpson RJ, et al. Restoration of full-length adenomatous polyposis coli (APC) protein in a colon cancer cell line enhances cell adhesion.. *J Cell Sci* 2004;117: 427-39.
- (104) Fayard B, Bianchi F, Dey J, Moreno E, Djaffer S, Hynes NE, et al. The serine protease inhibitor protease nexin-1 controls mammary cancer metastasis through LRP-1-mediated MMP-9 expression.. *Cancer Res* 2009;69: 5690-8.
- (105) Fearnhead NS, Britton MP, Bodmer WF. The ABC of APC.. *Hum Mol Genet* 2001;10: 721-33.
- (106) Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990;61: 759-767.
- (107) Fevr T, Robine S, Louvard D, Huelsken J. Wnt/beta-catenin is essential for intestinal homeostasis and maintenance of intestinal stem cells.. *Mol Cell Biol* 2007;27: 7551-9.
- (108) Flaherty KT, Infante JR, Daud A, Gonzalez R, Kefford RF, Sosman J, et al. Combined BRAF and MEK inhibition in melanoma with BRAF V600 mutations.. *N Engl J Med* 2012;367: 1694-703.
- (109) Forrester K, Almoguera C, Han K, Grizzle WE, Perucho M. Detection of high incidence of K-ras oncogenes during human colon tumorigenesis.. *Nature* 1987;327: 298-303.
- (110) Franklin DS, Godfrey VL, O'Brien DA, Deng C, Xiong Y. Functional collaboration between different cyclin-dependent kinase inhibitors suppresses tumor growth with distinct tissue specificity.. *Mol Cell Biol* 2000;20: 6147-58.

- (111) Fre S, Huyghe M, Mourikis P, Robine S, Louvard D, Artavanis-Tsakonas S. Notch signals control the fate of immature progenitor cells in the intestine.. *Nature* 2005;435: 964-8.
- (112) Fremin C, Meloche S. From basic research to clinical development of MEK1/2 inhibitors for cancer therapy.. *J Hematol Oncol* 2010;3: 8-8722-3-8.
- (113) Friday BB, Adjei AA. Advances in targeting the Ras/Raf/MEK/Erk mitogen-activated protein kinase cascade with MEK inhibitors for cancer therapy.. *Clin Cancer Res* 2008;14: 342-6.
- (114) Fu L, Sheng JQ, Sun ZQ, Han M, Huang JS, Mu H, et al. Mutation of hMLH1 and hMSH2 genes in hereditary nonpolyposis colorectal cancer: analysis of 76 probands]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2008;88: 1983-5.
- (115) Gan XQ, Wang JY, Xi Y, Wu ZL, Li YP, Li L. Nuclear Dvl, c-Jun, beta-catenin, and TCF form a complex leading to stabilization of beta-catenin-TCF interaction.. *J Cell Biol* 2008;180: 1087-100.
- (116) Gan Y, Shi C, Inge L, Hibner M, Balducci J, Huang Y. Differential roles of ERK and Akt pathways in regulation of EGFR-mediated signaling and motility in prostate cancer cells.. *Oncogene* 2010;29: 4947-58.
- (117) Gao N, White P, Kaestner KH. Establishment of intestinal identity and epithelial-mesenchymal signaling by Cdx2. *Dev Cell* 2009;16: 588-599.
- (118) Gao S, Krogdahl A, Sorensen JA, Kousted TM, Dabelsteen E, Andreasen PA. Overexpression of protease nexin-1 mRNA and protein in oral squamous cell carcinomas.. *Oral Oncol* 2008;44: 309-13.
- (119) Garneau H, Paquin MC, Carrier JC, Rivard N. E2F4 expression is required for cell cycle progression of normal intestinal crypt cells and colorectal cancer cells.. *J Cell Physiol* 2009;221: 350-8.
- (120) Gately S, Li WW. Multiple roles of COX-2 in tumor angiogenesis: a target for antiangiogenic therapy.. *Semin Oncol* 2004;31: 2-11.
- (121) German MS, Wang J, Chadwick RB, Rutter WJ. Synergistic activation of the insulin gene by a LIM-homeo domain protein and a basic helix-loop-helix protein: building a functional insulin minienhancer complex. *Genes Dev* 1992;6: 2165-2176.
- (122) Gomes-Giacoia E, Miyake M, Goodison S, Rosser CJ. Targeting plasminogen activator inhibitor-1 inhibits angiogenesis and tumor growth in a human cancer xenograft model.. *Mol Cancer Ther* 2013;12: 2697-708.
- (123) Gopalbhai K, Meloche S. Repression of mitogen-activated protein kinases ERK1/ERK2 activity by a protein tyrosine phosphatase in rat fibroblasts transformed by upstream oncoproteins.. *J Cell Physiol* 1998;174: 35-47.

- (124) Grasset E, Bernabeu J, Pinto M. Epithelial properties of human colonic carcinoma cell line Caco-2: effect of secretagogues.. *Am J Physiol* 1985;248: C410-8.
- (125) Greenburg G, Hay ED. Epithelia suspended in collagen gels can lose polarity and express characteristics of migrating mesenchymal cells.. *J Cell Biol* 1982;95: 333-9.
- (126) Gregorieff A, Clevers H. Wnt signaling in the intestinal epithelium: from endoderm to cancer. *Genes Dev* 2005;19: 877-890.
- (127) Greulich H, Erikson RL. An analysis of Mek1 signaling in cell proliferation and transformation.. *J Biol Chem* 1998;273: 13280-8.
- (128) Greulich H, Reichman C, Hanafusa H. Delay in serum stimulation of Erk activity caused by oncogenic transformation.. *Oncogene* 1996;12: 1689-95.
- (129) Groschwitz KR, Hogan SP. Intestinal barrier function: molecular regulation and disease pathogenesis. *J Allergy Clin Immunol* 2009;124: 3-20; quiz 21-2.
- (130) Gross I, Lhermitte B, Domon-Dell C, Duluc I, Martin E, Gaiddon C, et al. Phosphorylation of the homeotic tumor suppressor Cdx2 mediates its ubiquitin-dependent proteasome degradation. *Oncogene* 2005;24: 7955-7963.
- (131) Grotegut S, von Schweinitz D, Christofori G, Lehembre F. Hepatocyte growth factor induces cell scattering through MAPK/Egr-1-mediated upregulation of Snail.. *EMBO J* 2006;25: 3534-45.
- (132) Guan H, Smirnov DA, Ricciardi RP. Identification of genes associated with adenovirus 12 tumorigenesis by microarray.. *Virology* 2003;309: 114-24.
- (133) Guarino M, Rubino B, Ballabio G. The role of epithelial-mesenchymal transition in cancer pathology. *Pathology* 2007;39: 305-318.
- (134) Guertin DA, Sabatini DM. Defining the role of mTOR in cancer.. *Cancer Cell* 2007;12: 9-22.
- (135) Guo RJ, Suh ER, Lynch JP. The role of Cdx proteins in intestinal development and cancer.. *Cancer Biol Ther* 2004;3: 593-601.
- (136) Gutierrez LS, Suckow M, Lawler J, Ploplis VA, Castellino FJ. Thrombospondin 1--a regulator of adenoma growth and carcinoma progression in the APC(Min/+) mouse model.. *Carcinogenesis* 2003;24: 199-207.
- (137) Haigis KM, Kendall KR, Wang Y, Cheung A, Haigis MC, Glickman JN, et al. Differential effects of oncogenic K-Ras and N-Ras on proliferation, differentiation and tumor progression in the colon. *Nat Genet* 2008;40: 600-608.
- (138) Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation.. *Cell* 2011;144: 646-74.
- (139) Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer.. *Cell* 2000;100: 57-70.

- (140) Harada H, Quearry B, Ruiz-Vela A, Korsmeyer SJ. Survival factor-induced extracellular signal-regulated kinase phosphorylates BIM, inhibiting its association with BAX and proapoptotic activity.. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101: 15313-7.
- (141) Hayakawa J, Ohmichi M, Kurachi H, Kanda Y, Hisamoto K, Nishio Y, et al. Inhibition of BAD phosphorylation either at serine 112 via extracellular signal-regulated protein kinase cascade or at serine 136 via Akt cascade sensitizes human ovarian cancer cells to cisplatin.. *Cancer Res* 2000;60: 5988-94.
- (142) He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, da Costa LT, et al. Identification of c-MYC as a target of the APC pathway.. *Science* 1998;281: 1509-12.
- (143) He X, Semenov M, Tamai K, Zeng X. LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/beta-catenin signaling: arrows point the way. *Development* 2004;131: 1663-1677.
- (144) Hill CS, Marais R, John S, Wynne J, Dalton S, Treisman R. Functional analysis of a growth factor-responsive transcription factor complex.. *Cell* 1993;73: 395-406.
- (145) Hinoi T, Akyol A, Theisen BK, Ferguson DO, Greenson JK, Williams BO, et al. Mouse model of colonic adenoma-carcinoma progression based on somatic Apc inactivation.. *Cancer Res* 2007;67: 9721-30.
- (146) Hinoi T, Loda M, Fearon ER. Silencing of CDX2 expression in colon cancer via a dominant repression pathway. *J Biol Chem* 2003;278: 44608-44616.
- (147) Hinoi T, Tani M, Lucas PC, Caca K, Dunn RL, Macri E, et al. Loss of CDX2 expression and microsatellite instability are prominent features of large cell minimally differentiated carcinomas of the colon. *Am J Pathol* 2001;159: 2239-2248.
- (148) Horst D, Chen J, Morikawa T, Ogino S, Kirchner T, Shivdasani RA. Differential WNT activity in colorectal cancer confers limited tumorigenic potential and is regulated by MAPK signaling. *Cancer Res* 2012;72: 1547-1556.
- (149) Hoshino R, Chatani Y, Yamori T, Tsuruo T, Oka H, Yoshida O, et al. Constitutive activation of the 41-/43-kDa mitogen-activated protein kinase signaling pathway in human tumors.. *Oncogene* 1999;18: 813-22.
- (150) Houde M, Laprise P, Jean D, Blais M, Asselin C, Rivard N. Intestinal epithelial cell differentiation involves activation of p38 mitogen-activated protein kinase that regulates the homeobox transcription factor CDX2.. *J Biol Chem* 2001;276: 21885-94.
- (151) Howe JR, Bair JL, Sayed MG, Anderson ME, Mitros FA, Petersen GM, et al. Germline mutations of the gene encoding bone morphogenetic protein receptor 1A in juvenile polyposis.. *Nat Genet* 2001;28: 184-7.

- (152) Howe JR, Roth S, Ringold JC, Summers RW, Jarvinen HJ, Sistonen P, et al. Mutations in the SMAD4/DPC4 gene in juvenile polyposis.. *Science* 1998;280: 1086-8.
- (153) Huang CY, Tan TH. DUSPs, to MAP kinases and beyond.. *Cell Biosci* 2012;2: 24-3701-2-24.
- (154) Huber O, Korn R, McLaughlin J, Ohsugi M, Herrmann BG, Kemler R. Nuclear localization of beta-catenin by interaction with transcription factor LEF-1.. *Mech Dev* 1996;59: 3-10.
- (155) Huser M, Luckett J, Chiloeches A, Mercer K, Iwobi M, Giblett S, et al. MEK kinase activity is not necessary for Raf-1 function.. *EMBO J* 2001;20: 1940-51.
- (156) Ignatenko NA, Holubec H, Besselsen DG, Blohm-Mangone KA, Padilla-Torres JL, Nagle RB, et al. Role of c-Myc in intestinal tumorigenesis of the ApcMin/+ mouse. *Cancer Biol Ther* 2006;5: 1658-1664.
- (157) Irby RB, McCarthy SM, Yeatman TJ. Osteopontin regulates multiple functions contributing to human colon cancer development and progression.. *Clin Exp Metastasis* 2004;21: 515-23.
- (158) Ireland H, Kemp R, Houghton C, Howard L, Clarke AR, Sansom OJ, et al. Inducible Cre-mediated control of gene expression in the murine gastrointestinal tract: effect of loss of beta-catenin.. *Gastroenterology* 2004;126: 1236-46.
- (159) Ishida-Takagishi M, Enomoto A, Asai N, Ushida K, Watanabe T, Hashimoto T, et al. The Dishevelled-associating protein Daple controls the non-canonical Wnt/Rac pathway and cell motility. *Nat Commun* 2012;3: 859.
- (160) Iverson C, Larson G, Lai C, Yeh LT, Dadson C, Weingarten P, et al. RDEA119/BAY 869766: a potent, selective, allosteric inhibitor of MEK1/2 for the treatment of cancer.. *Cancer Res* 2009;69: 6839-47.
- (161) Ivy SP, Wick JY, Kaufman BM. An overview of small-molecule inhibitors of VEGFR signaling.. *Nat Rev Clin Oncol* 2009;6: 569-79.
- (162) Iwao K, Miyoshi Y, Nawa G, Yoshikawa H, Ochi T, Nakamura Y. Frequent beta-catenin abnormalities in bone and soft-tissue tumors.. *Jpn J Cancer Res* 1999;90: 205-9.
- (163) James R, Kazenwadel J. Homeobox gene expression in the intestinal epithelium of adult mice. *J Biol Chem* 1991;266: 3246-3251.
- (164) Janda E, Lehmann K, Killisch I, Jechlinger M, Herzig M, Downward J, et al. Ras and TGF[beta] cooperatively regulate epithelial cell plasticity and metastasis: dissection of Ras signaling pathways.. *J Cell Biol* 2002;156: 299-313.
- (165) Janssen KP, el-Marjou F, Pinto D, Sastre X, Rouillard D, Fouquet C, et al. Targeted expression of oncogenic K-ras in intestinal epithelium causes spontaneous tumorigenesis in mice.. *Gastroenterology* 2002;123: 492-504.

- (166) Janssen KP, Alberici P, Fsihi H, Gaspar C, Breukel C, Franken P, et al. APC and oncogenic KRAS are synergistic in enhancing Wnt signaling in intestinal tumor formation and progression. *Gastroenterology* 2006;131: 1096-1109.
- (167) Jarriault S, Brou C, Logeat F, Schroeter EH, Kopan R, Israel A. Signalling downstream of activated mammalian Notch.. *Nature* 1995;377: 355-8.
- (168) Jasleen J, Shimoda N, Shen ER, Tavakkolizadeh A, Whang EE, Jacobs DO, et al. Signaling mechanisms of glucagon-like peptide 2-induced intestinal epithelial cell proliferation. *J Surg Res* 2000;90: 13-18.
- (169) Jass JR. Wnt pathway may not be implicated in all routes to colorectal cancer.. *Gut* 2007;56: 309; author reply 309-10.
- (170) Jeanes A, Gottardi CJ, Yap AS. Cadherins and cancer: how does cadherin dysfunction promote tumor progression? *Oncogene* 2008;27: 6920-6929.
- (171) Jen J, Powell SM, Papadopoulos N, Smith KJ, Hamilton SR, Vogelstein B, et al. Molecular determinants of dysplasia in colorectal lesions.. *Cancer Res* 1994;54: 5523-6.
- (172) Jhawer M, Goel S, Wilson AJ, Montagna C, Ling YH, Byun DS, et al. PIK3CA mutation/PTEN expression status predicts response of colon cancer cells to the epidermal growth factor receptor inhibitor cetuximab.. *Cancer Res* 2008;68: 1953-61.
- (173) Kaimaktchiev V, Terracciano L, Tornillo L, Spichtin H, Stoios D, Bundi M, et al. The homeobox intestinal differentiation factor CDX2 is selectively expressed in gastrointestinal adenocarcinomas. *Mod Pathol* 2004;17: 1392-1399.
- (174) Kaiser GC, Yan F, Polk DB. Conversion of TNF alpha from antiproliferative to proliferative ligand in mouse intestinal epithelial cells by regulating mitogen-activated protein kinase.. *Exp Cell Res* 1999;249: 349-58.
- (175) Kalluri R, Neilson EG. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis.. *J Clin Invest* 2003;112: 1776-84.
- (176) Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition.. *J Clin Invest* 2009;119: 1420-8.
- (177) Karnoub AE, Weinberg RA. Ras oncogenes: split personalities.. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008;9: 517-31.
- (178) Karreth FA, Tuveson DA. Modelling oncogenic Ras/Raf signalling in the mouse.. *Curr Opin Genet Dev* 2009;19: 4-11.
- (179) Keller MS, Ezaki T, Guo RJ, Lynch JP. Cdx1 or Cdx2 expression activates E-cadherin-mediated cell-cell adhesion and compaction in human COLO 205 cells.. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004;287: G104-14.

- (180) Kennel SJ, Foote LJ, Falcioni R, Sonnenberg A, Stringer CD, Crouse C, et al. Analysis of the tumor-associated antigen TSP-180. Identity with alpha 6-beta 4 in the integrin superfamily.. *J Biol Chem* 1989;264: 15515-21.
- (181) Keyse SM. Protein phosphatases and the regulation of mitogen-activated protein kinase signalling.. *Curr Opin Cell Biol* 2000;12: 186-92.
- (182) Kikuchi A. Roles of Axin in the Wnt signalling pathway.. *Cell Signal* 1999;11: 777-88.
- (183) Kim I, Pan W, Jones SA, Zhang Y, Zhuang X, Wu D. Clathrin and AP2 are required for PtdIns(4,5)P2-mediated formation of LRP6 signalosomes.. *J Cell Biol* 2013;200: 419-28.
- (184) Kim YS, Ho SB. Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress. *Curr Gastroenterol Rep* 2010;12: 319-330.
- (185) King AJ, Arnone MR, Bleam MR, Moss KG, Yang J, Fedorowicz KE, et al. Dabrafenib; preclinical characterization, increased efficacy when combined with trametinib, while BRAF/MEK tool combination reduced skin lesions.. *PLoS One* 2013;8: e67583.
- (186) King SL, Dekaney CM. Small intestinal stem cells. *Curr Opin Gastroenterol* 2013;29: 140-145.
- (187) Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer.. *Cell* 1996;87: 159-70.
- (188) Klemke RL, Cai S, Giannini AL, Gallagher PJ, de Lanerolle P, Cheresch DA. Regulation of cell motility by mitogen-activated protein kinase.. *J Cell Biol* 1997;137: 481-92.
- (189) Kolch W. Coordinating ERK/MAPK signalling through scaffolds and inhibitors.. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005;6: 827-37.
- (190) Kolch W. Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions.. *Biochem J* 2000;351 Pt 2: 289-305.
- (191) Kolch W, Heidecker G, Kochs G, Hummel R, Vahidi H, Mischak H, et al. Protein kinase C alpha activates RAF-1 by direct phosphorylation.. *Nature* 1993;364: 249-52.
- (192) Komatsu K, Buchanan FG, Otaka M, Jin M, Odashima M, Horikawa Y, et al. Gene expression profiling following constitutive activation of MEK1 and transformation of rat intestinal epithelial cells.. *Mol Cancer* 2006;5: 63.
- (193) Kong D, Li Y, Wang Z, Sarkar FH. Cancer Stem Cells and Epithelial-to-Mesenchymal Transition (EMT)-Phenotypic Cells: Are They Cousins or Twins?. *Cancers (Basel)* 2011;3: 716-29.
- (194) Kongkanunt R, Bubb VJ, Sansom OJ, Wyllie AH, Harrison DJ, Clarke AR. Dysregulated expression of beta-catenin marks early neoplastic change in Apc mutant mice, but not all lesions arising in Msh2 deficient mice.. *Oncogene* 1999;18: 7219-25.

- (195) Korinek V, Barker N, Moerer P, van Donselaar E, Huls G, Peters PJ, et al. Depletion of epithelial stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking Tcf-4.. *Nat Genet* 1998;19: 379-83.
- (196) Korinek V, Barker N, Morin PJ, van Wichen D, de Weger R, Kinzler KW, et al. Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC-/- colon carcinoma.. *Science* 1997;275: 1784-7.
- (197) Krejci P, Aklian A, Kaucka M, Sevcikova E, Prochazkova J, Masek JK, et al. Receptor tyrosine kinases activate canonical WNT/beta-catenin signaling via MAP kinase/LRP6 pathway and direct beta-catenin phosphorylation. *PLoS One* 2012;7: e35826.
- (198) Kress TR, Raabe T, Feller SM. High Erk activity suppresses expression of the cell cycle inhibitor p27Kip1 in colorectal cancer cells.. *Cell Commun Signal* 2010;8: 1-811X-8-1.
- (199) Krishnamachary B, Zagzag D, Nagasawa H, Rainey K, Okuyama H, Baek JH, et al. Hypoxia-inducible factor-1-dependent repression of E-cadherin in von Hippel-Lindau tumor suppressor-null renal cell carcinoma mediated by TCF3, ZFHX1A, and ZFHX1B.. *Cancer Res* 2006;66: 2725-31.
- (200) Krueger F, Madeja Z, Hemberger M, McMahon M, Cook SJ, Gaunt SJ. Down-regulation of Cdx2 in colorectal carcinoma cells by the Raf-MEK-ERK 1/2 pathway. *Cell Signal* 2009;21: 1846-1856.
- (201) Kuhnert F, Davis CR, Wang HT, Chu P, Lee M, Yuan J, et al. 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* 2004;101: 266-71.
- (202) Kuno Y, Kondo K, Iwata H, Senga T, Akiyama S, Ito K, et al. Tumor-specific activation of mitogen-activated protein kinase in human colorectal and gastric carcinoma tissues.. *Jpn J Cancer Res* 1998;89: 903-9.
- (203) La Thangue NB. DP and E2F proteins: components of a heterodimeric transcription factor implicated in cell cycle control. *Curr Opin Cell Biol* 1994;6: 443-450.
- (204) Lambert V, Munaut C, Carmeliet P, Gerard RD, Declerck PJ, Gils A, et al. Dose-dependent modulation of choroidal neovascularization by plasminogen activator inhibitor type I: implications for clinical trials.. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44: 2791-7.
- (205) Laprise P, Chailier P, Houde M, Beaulieu JF, Boucher MJ, Rivard N. Phosphatidylinositol 3-kinase controls human intestinal epithelial cell differentiation by promoting adherens junction assembly and p38 MAPK activation. *J Biol Chem* 2002;277: 8226-8234.
- (206) Laprise P, Langlois MJ, Boucher MJ, Jobin C, Rivard N. Down-regulation of MEK/ERK signaling by E-cadherin-dependent PI3K/Akt pathway in differentiating intestinal epithelial cells. *J Cell Physiol* 2004;199: 32-39.

- (207) Lawler J. Thrombospondin-1 as an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth.. *J Cell Mol Med* 2002;6: 1-12.
- (208) Lee SH, Hu LL, Gonzalez-Navajas J, Seo GS, Shen C, Brick J, et al. ERK activation drives intestinal tumorigenesis in *Apc(min/+)* mice.. *Nat Med* 2010;16: 665-70.
- (209) Lee SH, Lee JW, Soung YH, Kim SY, Nam SW, Park WS, et al. Colorectal tumors frequently express phosphorylated mitogen-activated protein kinase. *APMIS* 2004;112: 233-238.
- (210) Lehmann K, Janda E, Pierreux CE, Rytomaa M, Schulze A, McMahon M, et al. Raf induces TGFbeta production while blocking its apoptotic but not invasive responses: a mechanism leading to increased malignancy in epithelial cells.. *Genes Dev* 2000;14: 2610-22.
- (211) Lemieux E, Bergeron S, Durand V, Asselin C, Saucier C, Rivard N. Constitutively active MEK1 is sufficient to induce epithelial-to-mesenchymal transition in intestinal epithelial cells and to promote tumor invasion and metastasis. *Int J Cancer* 2009;125: 1575-1586.
- (212) Li G, Hu Y, Huo Y, Liu M, Freeman D, Gao J, et al. PTEN deletion leads to up-regulation of a secreted growth factor pleiotrophin.. *J Biol Chem* 2006;281: 10663-8.
- (213) Licato LL, Brenner DA. Analysis of signaling protein kinases in human colon or colorectal carcinomas.. *Dig Dis Sci* 1998;43: 1454-64.
- (214) Lilien J, Balsamo J, Arregui C, Xu G. Turn-off, drop-out: functional state switching of cadherins.. *Dev Dyn* 2002;224: 18-29.
- (215) Liu P, Cheng H, Roberts TM, Zhao JJ. Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer.. *Nat Rev Drug Discov* 2009;8: 627-44.
- (216) Liu W, Dong X, Mai M, Seelan RS, Taniguchi K, Krishnadath KK, et al. Mutations in *AXIN2* cause colorectal cancer with defective mismatch repair by activating beta-catenin/TCF signalling.. *Nat Genet* 2000;26: 146-7.
- (217) Loeb LA. Mutator phenotype may be required for multistage carcinogenesis.. *Cancer Res* 1991;51: 3075-9.
- (218) Lorentz O, Duluc I, Arcangelis AD, Simon-Assmann P, Kedinger M, Freund JN. Key role of the *Cdx2* homeobox gene in extracellular matrix-mediated intestinal cell differentiation. *J Cell Biol* 1997;139: 1553-1565.
- (219) Lorusso PM, Adjei AA, Varterasian M, Gadgeel S, Reid J, Mitchell DY, et al. Phase I and pharmacodynamic study of the oral MEK inhibitor CI-1040 in patients with advanced malignancies.. *J Clin Oncol* 2005;23: 5281-93.
- (220) Low DA, Baker JB, Koonce WC, Cunningham DD. Released protease-nexin regulates cellular binding, internalization, and degradation of serine proteases.. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981;78: 2340-4.

- (221) Lundberg AS, Weinberg RA. Functional inactivation of the retinoblastoma protein requires sequential modification by at least two distinct cyclin-cdk complexes. *Mol Cell Biol* 1998;18: 753-761.
- (222) Luo F, Brooks DG, Ye H, Hamoudi R, Poulogiannis G, Patek CE, et al. Mutated K-ras(Asp12) promotes tumorigenesis in Apc(Min) mice more in the large than the small intestines, with synergistic effects between K-ras and Wnt pathways. *Int J Exp Pathol* 2009;90: 558-574.
- (223) Luo J, Chen J, Deng ZL, Luo X, Song WX, Sharff KA, et al. Wnt signaling and human diseases: what are the therapeutic implications?. *Lab Invest* 2007;87: 97-103.
- (224) Lussier CR, Babeu JP, Auclair BA, Perreault N, Boudreau F. Hepatocyte nuclear factor-4alpha promotes differentiation of intestinal epithelial cells in a coculture system.. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008;294: G418-28.
- (225) Lynch HT, Smyrk TC. Identifying hereditary nonpolyposis colorectal cancer.. *N Engl J Med* 1998;338: 1537-8.
- (226) Ma L, Lan F, Zheng Z, Xie F, Wang L, Liu W, et al. Epidermal growth factor (EGF) and interleukin (IL)-1beta synergistically promote ERK1/2-mediated invasive breast ductal cancer cell migration and invasion.. *Mol Cancer* 2012;11: 79-4598-11-79.
- (227) Madara JL. Regulation of the movement of solutes across tight junctions. *Annu Rev Physiol* 1998;60: 143-159.
- (228) Mallo GV, Rechreche H, Frigerio JM, Rocha D, Zweibaum A, Lacasa M, et al. Molecular cloning, sequencing and expression of the mRNA encoding human Cdx1 and Cdx2 homeobox. Down-regulation of Cdx1 and Cdx2 mRNA expression during colorectal carcinogenesis. *Int J Cancer* 1997;74: 35-44.
- (229) Mallo GV, Soubeyran P, Lissitzky JC, Andre F, Farnarier C, Marvaldi J, et al. Expression of the Cdx1 and Cdx2 homeotic genes leads to reduced malignancy in colon cancer-derived cells. *J Biol Chem* 1998;273: 14030-14036.
- (230) Mamajiwalla SN, Burgess DR. Differential regulation of the activity of the 42 kD mitogen activated protein kinase (p42mapk) during enterocyte differentiation in vivo. *Oncogene* 1995;11: 377-386.
- (231) Mao B, Wu W, Li Y, Hoppe D, Stanek P, Glinka A, et al. LDL-receptor-related protein 6 is a receptor for Dickkopf proteins. *Nature* 2001;411: 321-325.
- (232) Mao J, Wang J, Liu B, Pan W, Farr GH,3rd, Flynn C, et al. Low-density lipoprotein receptor-related protein-5 binds to Axin and regulates the canonical Wnt signaling pathway. *Mol Cell* 2001;7: 801-809.

- (233) Marais R, Light Y, Paterson HF, Mason CS, Marshall CJ. Differential regulation of Raf-1, A-Raf, and B-Raf by oncogenic ras and tyrosine kinases.. *J Biol Chem* 1997;272: 4378-83.
- (234) Mareel M, Leroy A. Clinical, cellular, and molecular aspects of cancer invasion.. *Physiol Rev* 2003;83: 337-76.
- (234b) Marieb (1999), *Anatomie et physiologie humaines*, De Boeck, p.854-860
- (235) Mariotti A, Kedeshian PA, Dans M, Curatola AM, Gagnoux-Palacios L, Giancotti FG. EGF-R signaling through Fyn kinase disrupts the function of integrin $\alpha 6 \beta 4$ at hemidesmosomes: role in epithelial cell migration and carcinoma invasion. *J Cell Biol* 2001;155: 447-458.
- (236) Marshall CJ. Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation.. *Cell* 1995;80: 179-85.
- (237) Matsuo Y, Campbell PM, Brekken RA, Sung B, Ouellette MM, Fleming JB, et al. K-Ras promotes angiogenesis mediated by immortalized human pancreatic epithelial cells through mitogen-activated protein kinase signaling pathways.. *Mol Cancer Res* 2009;7: 799-808.
- (238) Matsuzaki K, Seki T, Okazaki K. TGF-beta during human colorectal carcinogenesis: the shift from epithelial to mesenchymal signaling.. *Inflammopharmacology* 2006;14: 198-203.
- (239) McCawley LJ, Li S, Wattenberg EV, Hudson LG. Sustained activation of the mitogen-activated protein kinase pathway. A mechanism underlying receptor tyrosine kinase specificity for matrix metalloproteinase-9 induction and cell migration.. *J Biol Chem* 1999;274: 4347-53.
- (240) Mechta F, Lallemand D, Pfarr CM, Yaniv M. Transformation by ras modifies AP1 composition and activity.. *Oncogene* 1997;14: 837-47.
- (241) Medici D, Hay ED, Olsen BR. Snail and Slug promote epithelial-mesenchymal transition through beta-catenin-T-cell factor-4-dependent expression of transforming growth factor-beta3.. *Mol Biol Cell* 2008;19: 4875-87.
- (242) Meloche S, Seuwen K, Pages G, Pouyssegur J. Biphasic and synergistic activation of p44mapk (ERK1) by growth factors: correlation between late phase activation and mitogenicity.. *Mol Endocrinol* 1992;6: 845-54.
- (243) Mercer K, Chiloeches A, Huser M, Kiernan M, Marais R, Pritchard C. ERK signalling and oncogene transformation are not impaired in cells lacking A-Raf.. *Oncogene* 2002;21: 347-55.
- (244) Mercurio AM, Rabinovitz I. Towards a mechanistic understanding of tumor invasion--lessons from the $\alpha 6 \beta 4$ integrin. *Semin Cancer Biol* 2001;11: 129-141.
- (245) Metcalfe C, Bienz M. Inhibition of GSK3 by Wnt signalling--two contrasting models. *J Cell Sci* 2011;124: 3537-3544.

- (246) Micalizzi DS, Farabaugh SM, Ford HL. Epithelial-mesenchymal transition in cancer: parallels between normal development and tumor progression.. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2010;15: 117-34.
- (247) Mikula M, Schreiber M, Husak Z, Kucerova L, Ruth J, Wieser R, et al. Embryonic lethality and fetal liver apoptosis in mice lacking the c-raf-1 gene.. *EMBO J* 2001;20: 1952-62.
- (248) Milanini J, Vinals F, Pouyssegur J, Pages G. p42/p44 MAP kinase module plays a key role in the transcriptional regulation of the vascular endothelial growth factor gene in fibroblasts.. *J Biol Chem* 1998;273: 18165-72.
- (249) Miller JR. The Wnts.. *Genome Biol* 2002;3: REVIEWS3001.
- (250) Mitic LL, Van Itallie CM, Anderson JM. Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions I. Tight junction structure and function: lessons from mutant animals and proteins. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000;279: G250-4.
- (251) Mologni L, Brussolo S, Ceccon M, Gambacorti-Passerini C. Synergistic effects of combined Wnt/KRAS inhibition in colorectal cancer cells.. *PLoS One* 2012;7: e51449.
- (252) Montesano R, Soriano JV, Hosseini G, Pepper MS, Schramek H. Constitutively active mitogen-activated protein kinase kinase MEK1 disrupts morphogenesis and induces an invasive phenotype in Madin-Darby canine kidney epithelial cells.. *Cell Growth Differ* 1999;10: 317-32.
- (253) Moore KA, Lemischka IR. Stem cells and their niches. *Science* 2006;311: 1880-1885.
- (254) Mor A, Philips MR. Compartmentalized Ras/MAPK signaling.. *Annu Rev Immunol* 2006;24: 771-800.
- (255) Morgan DO. Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1997;13: 261-291.
- (256) Morin PJ. Beta-Catenin Signaling and Cancer.. *Bioessays* 1999;21: 1021-30.
- (257) Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, Barker N, Clevers H, Vogelstein B, et al. Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC.. *Science* 1997;275: 1787-90.
- (258) Nagafuchi A, Shirayoshi Y, Okazaki K, Yasuda K, Takeichi M. Transformation of cell adhesion properties by exogenously introduced E-cadherin cDNA. *Nature* 1987;329: 341-343.
- (259) Nagahara A, Nakayama M, Oka D, Tsuchiya M, Kawashima A, Mukai M, et al. SERPINE2 is a possible candidate promotor for lymph node metastasis in testicular cancer.. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;391: 1641-6.
- (260) Nagase H, Nakamura Y. Mutations of the APC (adenomatous polyposis coli) gene.. *Hum Mutat* 1993;2: 425-34.

- (261) Naishiro Y, Yamada T, Takaoka AS, Hayashi R, Hasegawa F, Imai K, et al. Restoration of epithelial cell polarity in a colorectal cancer cell line by suppression of beta-catenin/T-cell factor 4-mediated gene transactivation. *Cancer Res* 2001;61: 2751-2758.
- (262) Nakamura Y, Tanaka F, Yoshikawa Y, Mimori K, Inoue H, Yanaga K, et al. PDGF-BB is a novel prognostic factor in colorectal cancer. *Ann Surg Oncol* 2008;15: 2129-36.
- (263) Narita M, Lowe SW. Executing cell senescence. *Cell Cycle* 2004;3: 244-6.
- (264) Nemoto T, Kubota S, Ishida H, Murata N, Hashimoto D. Ornithine decarboxylase, mitogen-activated protein kinase and matrix metalloproteinase-2 expressions in human colon tumors. *World J Gastroenterol* 2005;11: 3065-9.
- (265) Nialt TS, Baccarini M. Targets of Raf in tumorigenesis. *Carcinogenesis* 2010;31: 1165-1174.
- (266) Nishimura T. Total number of genome alterations in sporadic gastrointestinal cancer inferred from pooled analyses in the literature. *Tumour Biol* 2008;29: 343-50.
- (267) O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature* 2007;445: 106-10.
- (268) Oft M, Akhurst RJ, Balmain A. Metastasis is driven by sequential elevation of H-ras and Smad2 levels. *Nat Cell Biol* 2002;4: 487-94.
- (269) Oft M, Heider KH, Beug H. TGFbeta signaling is necessary for carcinoma cell invasiveness and metastasis. *Curr Biol* 1998;8: 1243-52.
- (270) Oft M, Peli J, Rudaz C, Schwarz H, Beug H, Reichmann E. TGF-beta1 and Ha-Ras collaborate in modulating the phenotypic plasticity and invasiveness of epithelial tumor cells. *Genes Dev* 1996;10: 2462-77.
- (271) O'Hagan RC, Heyer J. KRAS Mouse Models: Modeling Cancer Harboring KRAS Mutations. *Genes Cancer* 2011;2: 335-43.
- (272) Ohren JF, Chen H, Pavlovsky A, Whitehead C, Zhang E, Kuffa P, et al. Structures of human MAP kinase kinase 1 (MEK1) and MEK2 describe novel noncompetitive kinase inhibition. *Nat Struct Mol Biol* 2004;11: 1192-7.
- (273) Okada F, Rak JW, Croix BS, Lieubeau B, Kaya M, Roncari L, et al. Impact of oncogenes in tumor angiogenesis: mutant K-ras up-regulation of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor is necessary, but not sufficient for tumorigenicity of human colorectal carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95: 3609-14.
- (274) Okon K, Zazula M, Rudzki Z, Papla B, Osuch C, Stachura J. CDX-2 expression is reduced in colorectal carcinomas with solid growth pattern and proximal location, but is largely independent of MSI status. *Pol J Pathol* 2004;55: 9-14.

- (275) Orford K, Crockett C, Jensen JP, Weissman AM, Byers SW. Serine phosphorylation-regulated ubiquitination and degradation of beta-catenin. *J Biol Chem* 1997;272: 24735-24738.
- (276) Owens DM, Keyse SM. Differential regulation of MAP kinase signalling by dual-specificity protein phosphatases.. *Oncogene* 2007;26: 3203-13.
- (277) Pages G, Lenormand P, L'Allemain G, Chambard JC, Meloche S, Pouyssegur J. Mitogen-activated protein kinases p42mapk and p44mapk are required for fibroblast proliferation.. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90: 8319-23.
- (278) Paquin MC, Cagnol S, Carrier JC, Leblanc C, Rivard N. ERK-associated changes in E2F4 phosphorylation, localization and transcriptional activity during mitogenic stimulation in human intestinal epithelial crypt cells.. *BMC Cell Biol* 2013;14: 33-2121-14-33.
- (279) Park KS, Jeon SH, Kim SE, Bahk YY, Holmen SL, Williams BO, et al. APC inhibits ERK pathway activation and cellular proliferation induced by RAS.. *J Cell Sci* 2006;119: 819-27.
- (280) Patterson KI, Brummer T, O'Brien PM, Daly RJ. Dual-specificity phosphatases: critical regulators with diverse cellular targets.. *Biochem J* 2009;418: 475-89.
- (281) Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, et al. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions.. *Endocr Rev* 2001;22: 153-83.
- (282) Peinado H, Olmeda D, Cano A. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype?. *Nat Rev Cancer* 2007;7: 415-28.
- (283) Peinado H, Portillo F, Cano A. Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis.. *Int J Dev Biol* 2004;48: 365-75.
- (284) Peinado H, Quintanilla M, Cano A. Transforming growth factor beta-1 induces snail transcription factor in epithelial cell lines: mechanisms for epithelial mesenchymal transitions. *J Biol Chem* 2003;278: 21113-21123.
- (285) Peng L, Zhou Y, Wang Y, Mou H, Zhao Q. Prognostic significance of COX-2 immunohistochemical expression in colorectal cancer: a meta-analysis of the literature.. *PLoS One* 2013;8: e58891.
- (286) Perry RL, Parker MH, Rudnicki MA. Activated MEK1 binds the nuclear MyoD transcriptional complex to repress transactivation.. *Mol Cell* 2001;8: 291-301.
- (287) Peterson RL, Bozza MM, Dorner AJ. Interleukin-11 induces intestinal epithelial cell growth arrest through effects on retinoblastoma protein phosphorylation.. *Am J Pathol* 1996;149: 895-902.
- (288) Phelps RA, Chidester S, Dehghanizadeh S, Phelps J, Sandoval IT, Rai K, et al. A two-step model for colon adenoma initiation and progression caused by APC loss. *Cell* 2009;137: 623-634.

- (289) Pinto D, Clevers H. Wnt control of stem cells and differentiation in the intestinal epithelium.. *Exp Cell Res* 2005;306: 357-63.
- (290) Pinto D, Gregorieff A, Begthel H, Clevers H. Canonical Wnt signals are essential for homeostasis of the intestinal epithelium.. *Genes Dev* 2003;17: 1709-13.
- (291) Polakis P. The oncogenic activation of beta-catenin.. *Curr Opin Genet Dev* 1999;9: 15-21.
- (292) Pollock CB, Shirasawa S, Sasazuki T, Kolch W, Dhillon AS. Oncogenic K-RAS is required to maintain changes in cytoskeletal organization, adhesion, and motility in colon cancer cells.. *Cancer Res* 2005;65: 1244-50.
- (293) Porter EM, Bevins CL, Ghosh D, Ganz T. The multifaceted Paneth cell. *Cell Mol Life Sci* 2002;59: 156-170.
- (294) Potempa S, Ridley AJ. Activation of both MAP kinase and phosphatidylinositide 3-kinase by Ras is required for hepatocyte growth factor/scatter factor-induced adherens junction disassembly.. *Mol Biol Cell* 1998;9: 2185-200.
- (295) Pouyssegur J, Volmat V, Lenormand P. Fidelity and spatio-temporal control in MAP kinase (ERKs) signalling.. *Biochem Pharmacol* 2002;64: 755-63.
- (296) Powell SM, Zilz N, Beazer-Barclay Y, Bryan TM, Hamilton SR, Thibodeau SN, et al. APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis.. *Nature* 1992;359: 235-7.
- (297) Prahallad A, Sun C, Huang S, Di Nicolantonio F, Salazar R, Zecchin D, et al. Unresponsiveness of colon cancer to BRAF(V600E) inhibition through feedback activation of EGFR.. *Nature* 2012;483: 100-3.
- (298) Pretlow TP, Pretlow TG. Mutant KRAS in aberrant crypt foci (ACF): initiation of colorectal cancer? *Biochim Biophys Acta* 2005;1756: 83-96.
- (299) Pritchard CA, Samuels ML, Bosch E, McMahon M. Conditionally oncogenic forms of the A-Raf and B-Raf protein kinases display different biological and biochemical properties in NIH 3T3 cells.. *Mol Cell Biol* 1995;15: 6430-42.
- (300) Rabinovitz I, Mercurio AM. The integrin alpha6beta4 functions in carcinoma cell migration on laminin-1 by mediating the formation and stabilization of actin-containing motility structures. *J Cell Biol* 1997;139: 1873-1884.
- (301) Rabinovitz I, Toker A, Mercurio AM. Protein kinase C-dependent mobilization of the alpha6beta4 integrin from hemidesmosomes and its association with actin-rich cell protrusions drive the chemotactic migration of carcinoma cells. *J Cell Biol* 1999;146: 1147-1160.
- (302) Rad R, Cadinanos J, Rad L, Varela I, Strong A, Kriegl L, et al. A genetic progression model of Braf(V600E)-induced intestinal tumorigenesis reveals targets for therapeutic intervention.. *Cancer Cell* 2013;24: 15-29.

- (303) Radtke F, Clevers H. Self-renewal and cancer of the gut: two sides of a coin.. *Science* 2005;307: 1904-9.
- (304) Rak J, Filmus J, Finkenzeller G, Grugel S, Marme D, Kerbel RS. Oncogenes as inducers of tumor angiogenesis.. *Cancer Metastasis Rev* 1995;14: 263-77.
- (305) Rak J, Mitsuhashi Y, Sheehan C, Tamir A, Vilorio-Petit A, Filmus J, et al. Oncogenes and tumor angiogenesis: differential modes of vascular endothelial growth factor up-regulation in ras-transformed epithelial cells and fibroblasts.. *Cancer Res* 2000;60: 490-8.
- (306) Rakic JM, Maillard C, Jost M, Bajou K, Masson V, Devy L, et al. Role of plasminogen activator-plasmin system in tumor angiogenesis.. *Cell Mol Life Sci* 2003;60: 463-73.
- (307) Rayess H, Wang MB, Srivatsan ES. Cellular senescence and tumor suppressor gene p16.. *Int J Cancer* 2012;130: 1715-25.
- (308) Reddy KB, Nabha SM, Atanaskova N. Role of MAP kinase in tumor progression and invasion.. *Cancer Metastasis Rev* 2003;22: 395-403.
- (309) Ren S, Johnson BG, Kida Y, Ip C, Davidson KC, Lin SL, et al. LRP-6 is a coreceptor for multiple fibrogenic signaling pathways in pericytes and myofibroblasts that are inhibited by DKK-1.. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110: 1440-5.
- (310) Reynisdottir I, Polyak K, Iavarone A, Massague J. Kip/Cip and Ink4 Cdk inhibitors cooperate to induce cell cycle arrest in response to TGF-beta. *Genes Dev* 1995;9: 1831-1845.
- (311) Rhim JS. Neoplastic transformation of human epithelial cells in vitro.. *Anticancer Res* 1989;9: 1345-65.
- (312) Rhoads JM, Argenzio RA, Chen W, Rippe RA, Westwick JK, Cox AD, et al. L-glutamine stimulates intestinal cell proliferation and activates mitogen-activated protein kinases. *Am J Physiol* 1997;272: G943-53.
- (313) Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, Biffoni M, Todaro M, Peschle C, et al. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells.. *Nature* 2007;445: 111-5.
- (314) Richard DE, Berra E, Pouyssegur J. Angiogenesis: how a tumor adapts to hypoxia.. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;266: 718-22.
- (315) Richmond CA, Breault DT. Regulation of gene expression in the intestinal epithelium.. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2010;96: 207-29.
- (316) Rinehart J, Adjei AA, Lorusso PM, Waterhouse D, Hecht JR, Natale RB, et al. Multicenter phase II study of the oral MEK inhibitor, CI-1040, in patients with advanced non-small-cell lung, breast, colon, and pancreatic cancer.. *J Clin Oncol* 2004;22: 4456-62.

- (317) Rings EH, Boudreau F, Taylor JK, Moffett J, Suh ER, Traber PG. Phosphorylation of the serine 60 residue within the Cdx2 activation domain mediates its transactivation capacity. *Gastroenterology* 2001;121: 1437-1450.
- (318) Rivard N, L'Allemain G, Bartek J, Pouyssegur J. Abrogation of p27Kip1 by cDNA antisense suppresses quiescence (G0 state) in fibroblasts.. *J Biol Chem* 1996;271: 18337-41.
- (319) Rivard N, Boucher MJ, Asselin C, L'Allemain G. MAP kinase cascade is required for p27 downregulation and S phase entry in fibroblasts and epithelial cells. *Am J Physiol* 1999;277: C652-64.
- (320) Roberts PJ, Der CJ. Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer.. *Oncogene* 2007;26: 3291-310.
- (321) Romagnolo B, Berrebi D, Saadi-Keddoucci S, Porteu A, Pichard AL, Peuchmaur M, et al. Intestinal dysplasia and adenoma in transgenic mice after overexpression of an activated beta-catenin.. *Cancer Res* 1999;59: 3875-9.
- (322) Ross PJ, George M, Cunningham D, DiStefano F, Andreyev HJ, Workman P, et al. Inhibition of Kirsten-ras expression in human colorectal cancer using rationally selected Kirsten-ras antisense oligonucleotides.. *Mol Cancer Ther* 2001;1: 29-41.
- (323) Roux PP, Blenis J. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions.. *Microbiol Mol Biol Rev* 2004;68: 320-44.
- (324) Rubinfeld H, Hanoch T, Seger R. Identification of a cytoplasmic-retention sequence in ERK2.. *J Biol Chem* 1999;274: 30349-52.
- (325) Rusconi P, Caiola E, Broggin M. RAS/RAF/MEK inhibitors in oncology.. *Curr Med Chem* 2012;19: 1164-76.
- (326) Sancho E, Batlle E, Clevers H. Signaling pathways in intestinal development and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2004;20: 695-723.
- (327) Sansom OJ, Reed KR, Hayes AJ, Ireland H, Brinkmann H, Newton IP, et al. Loss of Apc in vivo immediately perturbs Wnt signaling, differentiation, and migration.. *Genes Dev* 2004;18: 1385-90.
- (328) Sansom OJ, Meniel V, Wilkins JA, Cole AM, Oien KA, Marsh V, et al. Loss of Apc allows phenotypic manifestation of the transforming properties of an endogenous K-ras oncogene in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103: 14122-14127.
- (329) Sansom OJ, Meniel VS, Muncan V, Pheese TJ, Wilkins JA, Reed KR, et al. Myc deletion rescues Apc deficiency in the small intestine. *Nature* 2007;446: 676-679.
- (330) Santaolalla R, Sussman DA, Ruiz JR, Davies JM, Pastorini C, Espana CL, et al. TLR4 activates the beta-catenin pathway to cause intestinal neoplasia.. *PLoS One* 2013;8: e63298.

- (331) Sarkar FH, Li Y, Wang Z, Kong D. NF-kappaB signaling pathway and its therapeutic implications in human diseases.. *Int Rev Immunol* 2008;27: 293-319.
- (332) Schmalhofer O, Brabletz S, Brabletz T. E-cadherin, beta-catenin, and ZEB1 in malignant progression of cancer.. *Cancer Metastasis Rev* 2009;28: 151-66.
- (333) Schmidt CR, Gi YJ, Patel TA, Coffey RJ, Beauchamp RD, Pearson AS. E-cadherin is regulated by the transcriptional repressor SLUG during Ras-mediated transformation of intestinal epithelial cells.. *Surgery* 2005;138: 306-12.
- (334) Schmitz KJ, Wohlschlaeger J, Alakus H, Bohr J, Stauder MA, Worm K, et al. Activation of extracellular regulated kinases (ERK1/2) but not AKT predicts poor prognosis in colorectal carcinoma and is associated with k-ras mutations.. *Virchows Arch* 2007;450: 151-9.
- (335) Schoenenberger CA, Matlin KS. Cell polarity and epithelial oncogenesis.. *Trends Cell Biol* 1991;1: 87-92.
- (336) Scholl C, Frohling S, Dunn IF, Schinzel AC, Barbie DA, Kim SY, et al. Synthetic lethal interaction between oncogenic KRAS dependency and STK33 suppression in human cancer cells.. *Cell* 2009;137: 821-34.
- (337) Schramek H, Feifel E, Marschitz I, Golochtchapova N, Gstraunthaler G, Montesano R. Loss of active MEK1-ERK1/2 restores epithelial phenotype and morphogenesis in transdifferentiated MDCK cells.. *Am J Physiol Cell Physiol* 2003;285: C652-61.
- (338) Schroeck F, Arroyo de Prada N, Sperl S, Schmitt M, Viktor M. Interaction of plasminogen activator inhibitor type-1 (PAI-1) with vitronectin (Vn): mapping the binding sites on PAI-1 and Vn.. *Biol Chem* 2002;383: 1143-9.
- (339) Schubbert S, Bollag G, Lyubynska N, Nguyen H, Kratz CP, Zenker M, et al. Biochemical and functional characterization of germ line KRAS mutations.. *Mol Cell Biol* 2007;27: 7765-70.
- (340) Scoville DH, Sato T, He XC, Li L. Current view: intestinal stem cells and signaling. *Gastroenterology* 2008;134: 849-864.
- (341) Sears R, Nuckolls F, Haura E, Taya Y, Tamai K, Nevins JR. Multiple Ras-dependent phosphorylation pathways regulate Myc protein stability.. *Genes Dev* 2000;14: 2501-14.
- (342) Sebolt-Leopold JS, Dudley DT, Herrera R, Van Becelaere K, Wiland A, Gowan RC, et al. Blockade of the MAP kinase pathway suppresses growth of colon tumors in vivo. *Nat Med* 1999;5: 810-816.
- (343) Segal NH, Saltz LB. Evolving treatment of advanced colon cancer.. *Annu Rev Med* 2009;60: 207-19.
- (344) Seger R, Krebs EG. The MAPK signaling cascade.. *FASEB J* 1995;9: 726-35.

- (345) Selzer-Plon J, Bornholdt J, Friis S, Bisgaard HC, Lothe IM, Tveit KM, et al. Expression of prostasin and its inhibitors during colorectal cancer carcinogenesis.. *BMC Cancer* 2009;9: 201-2407-9-201.
- (346) Shaul YD, Gibor G, Plotnikov A, Seger R. Specific phosphorylation and activation of ERK1c by MEK1b: a unique route in the ERK cascade.. *Genes Dev* 2009;23: 1779-90.
- (347) Shaul YD, Seger R. ERK1c regulates Golgi fragmentation during mitosis.. *J Cell Biol* 2006;172: 885-97.
- (348) Shaw LM, Rabinovitz I, Wang HH, Toker A, Mercurio AM. Activation of phosphoinositide 3-OH kinase by the alpha6beta4 integrin promotes carcinoma invasion. *Cell* 1997;91: 949-960.
- (349) Sheng G, Bernabe KQ, Guo J, Warner BW. Epidermal growth factor receptor-mediated proliferation of enterocytes requires p21waf1/cip1 expression.. *Gastroenterology* 2006;131: 153-64.
- (350) Sherr CJ, Roberts JM. Living with or without cyclins and cyclin-dependent kinases.. *Genes Dev* 2004;18: 2699-711.
- (351) Sherr CJ, Roberts JM. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* 1999;13: 1501-1512.
- (352) Sherr CJ, Roberts JM. Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev* 1995;9: 1149-1163.
- (353) Shi Y, Massague J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 2003;113: 685-700.
- (354) Shih JY, Yang PC. The EMT regulator slug and lung carcinogenesis.. *Carcinogenesis* 2011;32: 1299-304.
- (355) Silberg DG, Sullivan J, Kang E, Swain GP, Moffett J, Sund NJ, et al. Cdx2 ectopic expression induces gastric intestinal metaplasia in transgenic mice.. *Gastroenterology* 2002;122: 689-96.
- (356) Simon B, Weinel R, Hohne M, Watz J, Schmidt J, Kortner G, et al. Frequent alterations of the tumor suppressor genes p53 and DCC in human pancreatic carcinoma.. *Gastroenterology* 1994;106: 1645-51.
- (357) Singh A, Sweeney MF, Yu M, Burger A, Greninger P, Benes C, et al. TAK1 inhibition promotes apoptosis in KRAS-dependent colon cancers. *Cell* 2012;148: 639-650.
- (358) Sivaraman VS, Wang H, Nuovo GJ, Malbon CC. Hyperexpression of mitogen-activated protein kinase in human breast cancer.. *J Clin Invest* 1997;99: 1478-83.
- (359) Smakman N, Borel Rinkes IH, Voest EE, Kranenburg O. Control of colorectal metastasis formation by K-Ras. *Biochim Biophys Acta* 2005;1756: 103-114.

- (360) Smith G, Carey FA, Beattie J, Wilkie MJ, Lightfoot TJ, Coxhead J, et al. Mutations in APC, Kirsten-ras, and p53--alternative genetic pathways to colorectal cancer.. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99: 9433-8.
- (361) Sodhi A, Montaner S, Miyazaki H, Gutkind JS. MAPK and Akt act cooperatively but independently on hypoxia inducible factor-1alpha in rasV12 upregulation of VEGF.. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;287: 292-300.
- (362) Solanas G, Porta-de-la-Riva M, Agusti C, Casagolda D, Sanchez-Aguilera F, Larriba MJ, et al. E-cadherin controls beta-catenin and NF-kappaB transcriptional activity in mesenchymal gene expression. *J Cell Sci* 2008;121: 2224-2234.
- (363) Solit DB, Garraway LA, Pratilas CA, Sawai A, Getz G, Basso A, et al. BRAF mutation predicts sensitivity to MEK inhibition.. *Nature* 2006;439: 358-62.
- (364) Songyang Z, Lu KP, Kwon YT, Tsai LH, Filhol O, Cochet C, et al. A structural basis for substrate specificities of protein Ser/Thr kinases: primary sequence preference of casein kinases I and II, NIMA, phosphorylase kinase, calmodulin-dependent kinase II, CDK5, and Erk1.. *Mol Cell Biol* 1996;16: 6486-93.
- (365) Sparks AB, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW. Mutational analysis of the APC/beta-catenin/Tcf pathway in colorectal cancer.. *Cancer Res* 1998;58: 1130-4.
- (366) Stemmer V, de Craene B, Berx G, Behrens J. Snail promotes Wnt target gene expression and interacts with beta-catenin.. *Oncogene* 2008;27: 5075-80.
- (367) Stone SR, Nick H, Hofsteenge J, Monard D. Glial-derived neurite-promoting factor is a slow-binding inhibitor of trypsin, thrombin, and urokinase.. *Arch Biochem Biophys* 1987;252: 237-44.
- (368) Sugimoto M, Martin N, Wilks DP, Tamai K, Huot TJ, Pantoja C, et al. Activation of cyclin D1-kinase in murine fibroblasts lacking both p21(Cip1) and p27(Kip1).. *Oncogene* 2002;21: 8067-74.
- (369) Suh E, Traber PG. An intestine-specific homeobox gene regulates proliferation and differentiation.. *Mol Cell Biol* 1996;16: 619-25.
- (370) Suh E, Chen L, Taylor J, Traber PG. A homeodomain protein related to caudal regulates intestine-specific gene transcription. *Mol Cell Biol* 1994;14: 7340-7351.
- (371) Takebayashi Y, Akiyama S, Akiba S, Yamada K, Miyadera K, Sumizawa T, et al. Clinicopathologic and prognostic significance of an angiogenic factor, thymidine phosphorylase, in human colorectal carcinoma.. *J Natl Cancer Inst* 1996;88: 1110-7.
- (372) Tamura Y, Simizu S, Osada H. The phosphorylation status and anti-apoptotic activity of Bcl-2 are regulated by ERK and protein phosphatase 2A on the mitochondria.. *FEBS Lett* 2004;569: 249-55.

- (373) Tan DW, Barker N. Intestinal stem cells and their defining niche. *Curr Top Dev Biol* 2014;107: 77-107.
- (374) Taupin D, Podolsky DK. Mitogen-activated protein kinase activation regulates intestinal epithelial differentiation.. *Gastroenterology* 1999;116: 1072-80.
- (375) Tetsu O, McCormick F. Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells.. *Nature* 1999;398: 422-6.
- (376) Thiel G, Cibelli G. Regulation of life and death by the zinc finger transcription factor Egr-1.. *J Cell Physiol* 2002;193: 287-92.
- (377) Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression.. *Nat Rev Cancer* 2002;2: 442-54.
- (378) Tokunaga T, Tsuchida T, Kijima H, Okamoto K, Oshika Y, Sawa N, et al. Ribozyme-mediated inactivation of mutant K-ras oncogene in a colon cancer cell line.. *Br J Cancer* 2000;83: 833-9.
- (379) Toyota M, Issa JP. CpG island methylator phenotypes in aging and cancer.. *Semin Cancer Biol* 1999;9: 349-57.
- (380) Tran NH, Wu X, Frost JA. B-Raf and Raf-1 are regulated by distinct autoregulatory mechanisms.. *J Biol Chem* 2005;280: 16244-53.
- (381) Treinies I, Paterson HF, Hooper S, Wilson R, Marshall CJ. Activated MEK stimulates expression of AP-1 components independently of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-kinase) but requires a PI3-kinase signal To stimulate DNA synthesis.. *Mol Cell Biol* 1999;19: 321-9.
- (382) Treisman R. Regulation of transcription by MAP kinase cascades.. *Curr Opin Cell Biol* 1996;8: 205-15.
- (383) Trobridge P, Knoblaugh S, Washington MK, Munoz NM, Tsuchiya KD, Rojas A, et al. TGF-beta receptor inactivation and mutant Kras induce intestinal neoplasms in mice via a beta-catenin-independent pathway.. *Gastroenterology* 2009;136: 1680-8.e7.
- (384) Trusolino L, Bertotti A, Comoglio PM. A signaling adapter function for alpha6beta4 integrin in the control of HGF-dependent invasive growth. *Cell* 2001;107: 643-654.
- (385) Tse JC, Kalluri R. Mechanisms of metastasis: epithelial-to-mesenchymal transition and contribution of tumor microenvironment.. *J Cell Biochem* 2007;101: 816-29.
- (386) Vaiopoulos AG, Kostakis ID, Koutsilieris M, Papavassiliou AG. Colorectal cancer stem cells.. *Stem Cells* 2012;30: 363-71.
- (387) Valenta T, Hausmann G, Basler K. The many faces and functions of beta-catenin.. *EMBO J* 2012;31: 2714-36.

- (388) Van Cutsem E, van de Velde H, Karasek P, Oettle H, Vervenne WL, Szawlowski A, et al. Phase III trial of gemcitabine plus tipifarnib compared with gemcitabine plus placebo in advanced pancreatic cancer.. *J Clin Oncol* 2004;22: 1430-8.
- (389) van de Wetering M, Sancho E, Verweij C, de Lau W, Oving I, Hurlstone A, et al. The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells.. *Cell* 2002;111: 241-50.
- (390) van der Horst EH, Chinn L, Wang M, Velilla T, Tran H, Madrona Y, et al. Discovery of fully human anti-MET monoclonal antibodies with antitumor activity against colon cancer tumor models in vivo.. *Neoplasia* 2009;11: 355-64.
- (391) van Es JH, Haegerbarth A, Kujala P, Itzkovitz S, Koo BK, Boj SF, et al. A critical role for the Wnt effector Tcf4 in adult intestinal homeostatic self-renewal. *Mol Cell Biol* 2012;32: 1918-1927.
- (392) Van Waes C, Kozarsky KF, Warren AB, Kidd L, Paugh D, Liebert M, et al. The A9 antigen associated with aggressive human squamous carcinoma is structurally and functionally similar to the newly defined integrin alpha 6 beta 4.. *Cancer Res* 1991;51: 2395-402.
- (393) Vasioukhin V, Fuchs E. Actin dynamics and cell-cell adhesion in epithelia. *Curr Opin Cell Biol* 2001;13: 76-84.
- (394) Vaughn CP, Zobell SD, Furtado LV, Baker CL, Samowitz WS. Frequency of KRAS, BRAF, and NRAS mutations in colorectal cancer.. *Genes Chromosomes Cancer* 2011;50: 307-12.
- (395) Veeman MT, Axelrod JD, Moon RT. A second canon. Functions and mechanisms of beta-catenin-independent Wnt signaling.. *Dev Cell* 2003;5: 367-77.
- (396) Velazquez OC, Lederer HM, Rombeau JL. Butyrate and the colonocyte. Production, absorption, metabolism, and therapeutic implications. *Adv Exp Med Biol* 1997;427: 123-134.
- (397) Vermeulen PB, Salven P, Benoy I, Gasparini G, Dirix LY. Blood platelets and serum VEGF in cancer patients.. *Br J Cancer* 1999;79: 370-3.
- (398) Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development.. *N Engl J Med* 1988;319: 525-32.
- (399) Voisin L, Julien C, Duhamel S, Gopalbhai K, Claveau I, Saba-EI-Leil MK, et al. Activation of MEK1 or MEK2 isoform is sufficient to fully transform intestinal epithelial cells and induce the formation of metastatic tumors. *BMC Cancer* 2008;8: 337-2407-8-337.
- (400) Volpert OV, Stellmach V, Bouck N. The modulation of thrombospondin and other naturally occurring inhibitors of angiogenesis during tumor progression.. *Breast Cancer Res Treat* 1995;36: 119-26.

- (401) Wagle N, Van Allen EM, Treacy DJ, Frederick DT, Cooper ZA, Taylor-Weiner A, et al. MAP Kinase Pathway Alterations in BRAF-Mutant Melanoma Patients with Acquired Resistance to Combined RAF/MEK Inhibition.. *Cancer Discov* 2014;4: 61-8.
- (402) Walters JR. Recent findings in the cell and molecular biology of the small intestine.. *Curr Opin Gastroenterol* 2005;21: 135-40.
- (403) Wan PT, Garnett MJ, Roe SM, Lee S, Niculescu-Duvaz D, Good VM, et al. Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF.. *Cell* 2004;116: 855-67.
- (404) Wang H, Quah SY, Dong JM, Manser E, Tang JP, Zeng Q. PRL-3 down-regulates PTEN expression and signals through PI3K to promote epithelial-mesenchymal transition.. *Cancer Res* 2007;67: 2922-6.
- (405) Wang Q, Ding Q, Dong Z, Ehlers RA, Evers BM. Downregulation of mitogen-activated protein kinases in human colon cancers.. *Anticancer Res* 2000;20: 75-83.
- (406) Wang Y, Shi J, Chai K, Ying X, Zhou BP. The Role of Snail in EMT and Tumorigenesis.. *Curr Cancer Drug Targets* 2013;13: 963-72.
- (407) Waskiewicz AJ, Flynn A, Proud CG, Cooper JA. Mitogen-activated protein kinases activate the serine/threonine kinases Mnk1 and Mnk2.. *EMBO J* 1997;16: 1909-20.
- (408) Wee S, Jagani Z, Xiang KX, Loo A, Dorsch M, Yao YM, et al. PI3K pathway activation mediates resistance to MEK inhibitors in KRAS mutant cancers.. *Cancer Res* 2009;69: 4286-93.
- (409) Weekes CD, Von Hoff DD, Adjei AA, Leffingwell DP, Eckhardt SG, Gore L, et al. Multicenter phase I trial of the mitogen-activated protein kinase 1/2 inhibitor BAY 86-9766 in patients with advanced cancer.. *Clin Cancer Res* 2013;19: 1232-43.
- (410) Wei X. Mechanism of EGER-related cancer drug resistance.. *Anticancer Drugs* 2011;22: 963-70.
- (411) Weisenberger DJ, Siegmund KD, Campan M, Young J, Long TI, Faasse MA, et al. CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer.. *Nat Genet* 2006;38: 787-93.
- (412) Weitz J, Koch M, Debus J, Hohler T, Galle PR, Buchler MW. Colorectal cancer.. *Lancet* 2005;365: 153-65.
- (413) Werling RW, Yaziji H, Bacchi CE, Gown AM. CDX2, a highly sensitive and specific marker of adenocarcinomas of intestinal origin: an immunohistochemical survey of 476 primary and metastatic carcinomas. *Am J Surg Pathol* 2003;27: 303-310.
- (414) White MA, Nicolette C, Minden A, Polverino A, Van Aelst L, Karin M, et al. Multiple Ras functions can contribute to mammalian cell transformation.. *Cell* 1995;80: 533-41.

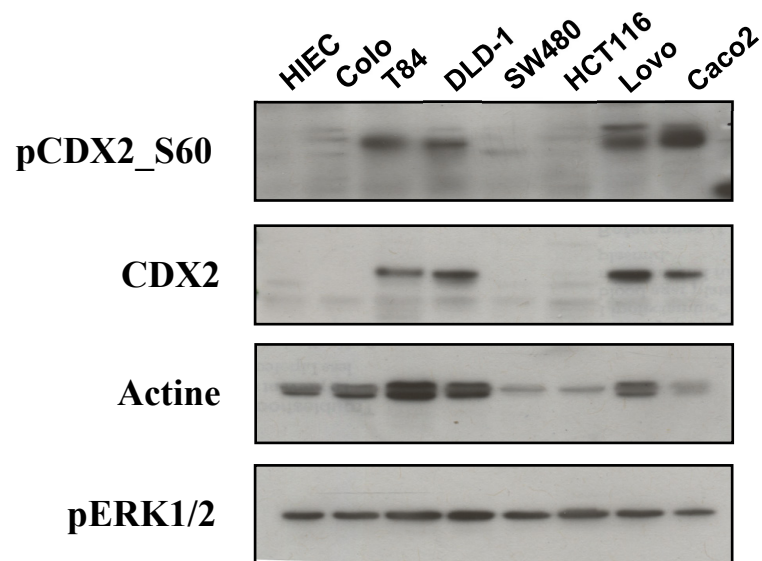
- (415) Wice BM, Trugnan G, Pinto M, Rousset M, Chevalier G, Dussaulx E, et al. The intracellular accumulation of UDP-N-acetylhexosamines is concomitant with the inability of human colon cancer cells to differentiate.. *J Biol Chem* 1985;260: 139-46.
- (416) Wolf GT, Carey TE, Schmaltz SP, McClatchey KD, Poore J, Glaser L, et al. Altered antigen expression predicts outcome in squamous cell carcinoma of the head and neck.. *J Natl Cancer Inst* 1990;82: 1566-72.
- (417) Wong SC, Ng SS, Cheung MT, Luk LY, Chan CM, Cheung AH, et al. Clinical significance of CDX2-positive circulating tumour cells in colorectal cancer patients. *Br J Cancer* 2011;104: 1000-1006.
- (418) Woodhouse EC, Chuaqui RF, Liotta LA. General mechanisms of metastasis.. *Cancer* 1997;80: 1529-37.
- (419) Worthley DL, Whitehall VL, Spring KJ, Leggett BA. Colorectal carcinogenesis: road maps to cancer.. *World J Gastroenterol* 2007;13: 3784-91.
- (420) Wu B, Crampton SP, Hughes CC. Wnt signaling induces matrix metalloproteinase expression and regulates T cell transmigration.. *Immunity* 2007;26: 227-39.
- (421) Wu X, Tu X, Joeng KS, Hilton MJ, Williams DA, Long F. Rac1 activation controls nuclear localization of beta-catenin during canonical Wnt signaling. *Cell* 2008;133: 340-353.
- (422) Wu Y, Zhou BP. Snail: More than EMT.. *Cell Adh Migr* 2010;4: 199-203.
- (423) Yang J, Weinberg RA. Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis.. *Dev Cell* 2008;14: 818-29.
- (424) Yeh JJ, Routh ED, Rubinas T, Peacock J, Martin TD, Shen XJ, et al. KRAS/BRAF mutation status and ERK1/2 activation as biomarkers for MEK1/2 inhibitor therapy in colorectal cancer.. *Mol Cancer Ther* 2009;8: 834-43.
- (425) Yekkala K, Baudino TA. Inhibition of intestinal polyposis with reduced angiogenesis in *ApcMin/+* mice due to decreases in c-Myc expression.. *Mol Cancer Res* 2007;5: 1296-303.
- (426) Yew PR. Ubiquitin-mediated proteolysis of vertebrate G1- and S-phase regulators.. *J Cell Physiol* 2001;187: 1-10.
- (427) Yip-Schneider MT, Lin A, Barnard D, Sweeney CJ, Marshall MS. Lack of elevated MAP kinase (Erk) activity in pancreatic carcinomas despite oncogenic K-ras expression.. *Int J Oncol* 1999;15: 271-9.
- (428) Yoakum GH, Lechner JF, Gabrielson EW, Korba BE, Malan-Shibley L, Willey JC, et al. Transformation of human bronchial epithelial cells transfected by Harvey ras oncogene.. *Science* 1985;227: 1174-9.

- (429) Yoon S, Seger R. The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions.. *Growth Factors* 2006;24: 21-44.
- (430) Young MR, Yang HS, Colburn NH. Promising molecular targets for cancer prevention: AP-1, NF-kappa B and Pcd4.. *Trends Mol Med* 2003;9: 36-41.
- (431) Yu X, Lin SG, Huang XR, Bacher M, Leng L, Bucala R, et al. Macrophage migration inhibitory factor induces MMP-9 expression in macrophages via the MEK-ERK MAP kinase pathway.. *J Interferon Cytokine Res* 2007;27: 103-9.
- (432) Yue J, Mulder KM. Requirement of Ras/MAPK pathway activation by transforming growth factor beta for transforming growth factor beta 1 production in a Smad-dependent pathway.. *J Biol Chem* 2000;275: 30765-73.
- (433) Yuen ST, Davies H, Chan TL, Ho JW, Bignell GR, Cox C, et al. Similarity of the phenotypic patterns associated with BRAF and KRAS mutations in colorectal neoplasia. *Cancer Res* 2002;62: 6451-6455.
- (434) Yung Y, Yao Z, Aebersold DM, Hanoch T, Seger R. Altered regulation of ERK1b by MEK1 and PTP-SL and modified Elk1 phosphorylation by ERK1b are caused by abrogation of the regulatory C-terminal sequence of ERKs.. *J Biol Chem* 2001;276: 35280-9.
- (435) Zeisberg M, Shah AA, Kalluri R. Bone morphogenic protein-7 induces mesenchymal to epithelial transition in adult renal fibroblasts and facilitates regeneration of injured kidney.. *J Biol Chem* 2005;280: 8094-100.
- (436) Zeng M, Kikuchi H, Pino MS, Chung DC. Hypoxia activates the K-ras proto-oncogene to stimulate angiogenesis and inhibit apoptosis in colon cancer cells.. *PLoS One* 2010;5: e10966.
- (437) Zhang BH, Guan KL. Regulation of the Raf kinase by phosphorylation.. *Exp Lung Res* 2001;27: 269-95.
- (438) Zhang BH, Guan KL. Activation of B-Raf kinase requires phosphorylation of the conserved residues Thr598 and Ser601.. *EMBO J* 2000;19: 5429-39.
- (439) Zhang H, Hannon GJ, Beach D. P21-Containing Cyclin Kinases Exist in both Active and Inactive States. *Genes Dev* 1994;8: 1750-1758.
- (440) Zhang W, Hart J, McLeod HL, Wang HL. Differential expression of the AP-1 transcription factor family members in human colorectal epithelial and neuroendocrine neoplasms.. *Am J Clin Pathol* 2005;124: 11-9.
- (441) Zhang YH, Wei W, Xu H, Wang YY, Wu WX. Inducing effects of hepatocyte growth factor on the expression of vascular endothelial growth factor in human colorectal carcinoma cells through MEK and PI3K signaling pathways.. *Chin Med J (Engl)* 2007;120: 743-8.

(442) Zhao Y, Bjorbaek C, Moller DE. Regulation and interaction of pp90(rsk) isoforms with mitogen-activated protein kinases.. J Biol Chem 1996;271: 29773-9.

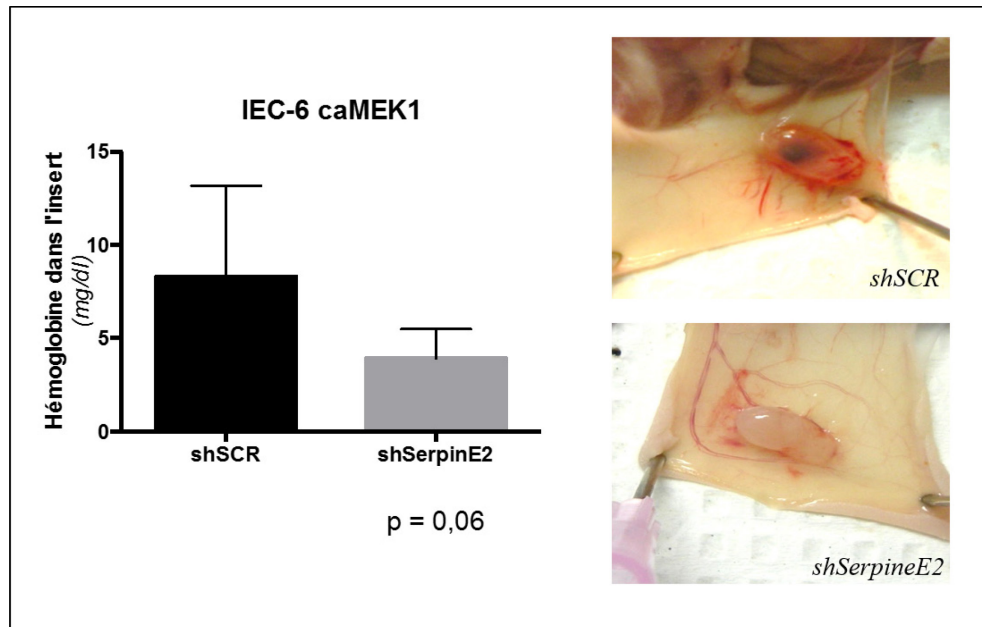
(443) Zindy F, Eischen CM, Randle DH, Kamijo T, Cleveland JL, Sherr CJ, et al. Myc signaling via the ARF tumor suppressor regulates p53-dependent apoptosis and immortalization. Genes Dev 1998;12: 2424-2433.

Annexes



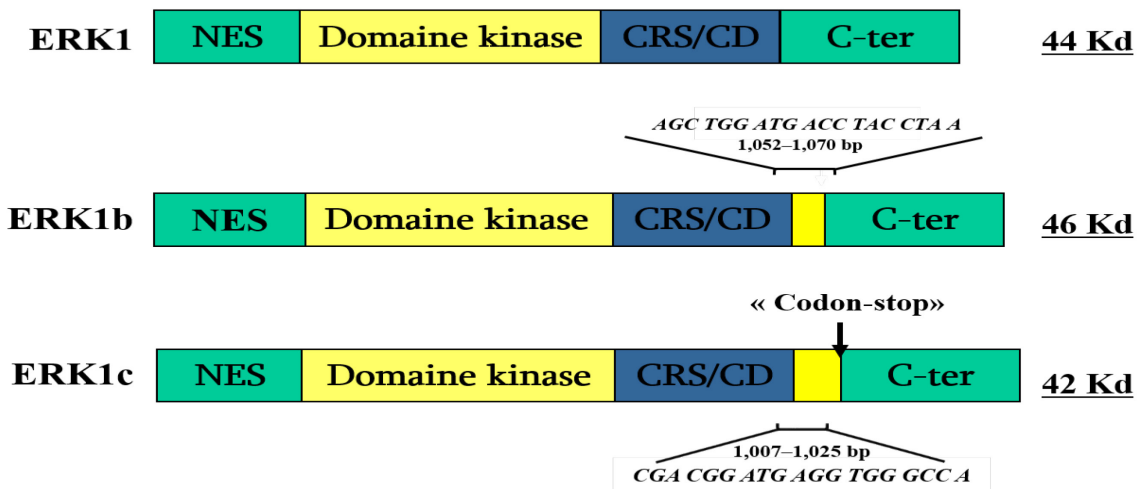
Annexe I : pCdx2/S60 dans les lignées cancéreuses colorectales humaines.

La lignée épithéliale normale (HIEC) et les lignées cancéreuses colorectales (Colo, T84, DLD-1, SW480, HCT116, Lovo et Caco-2) ont été lysées à sous-confluence et les lysats protéiques ont été séparés sur gel SDS-PAGE 10%. L'expression de Cdx2 phosphorylé sur la sérine 60 (pS60 Cdx2), de la forme totale de Cdx2, les formes phosphorylées (pERK1/2) et totales de ERK1/2 et de la β -actine ont été évaluées par immunobuvardage (N=3).



Annexe II : Rôle de la serpineE2 dans l'angiogenèse tumorale.

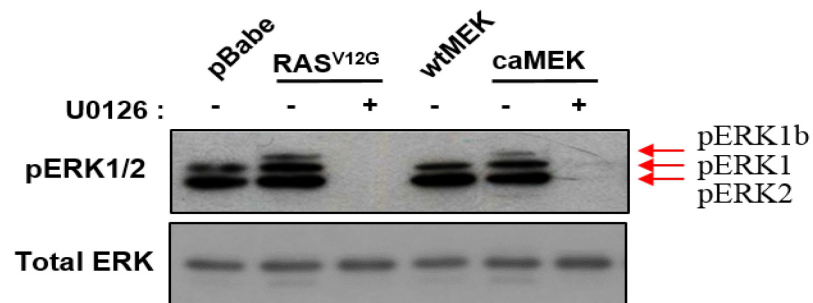
Essais d'angiogenèse *in vivo* consistant à implanter de façon sous-cutanée, chez la souris immunodéficiente, des inserts de matrigel contenant des cellules IEC-6 transformées par le caMEK1. **A)** Dosage de l'hémoglobine présente à l'intérieur des implants de matrigel contenant des cellules IEC-6 caMEK1 exprimant un shARN contrôle (shSCR) ou un shARN dirigé contre la serpineE2 (shSerpineE2) (N=1). **B)** Photographies représentatives des implants obtenus.



Annexe III : Représentation schématique des trois isoformes de ERK1.

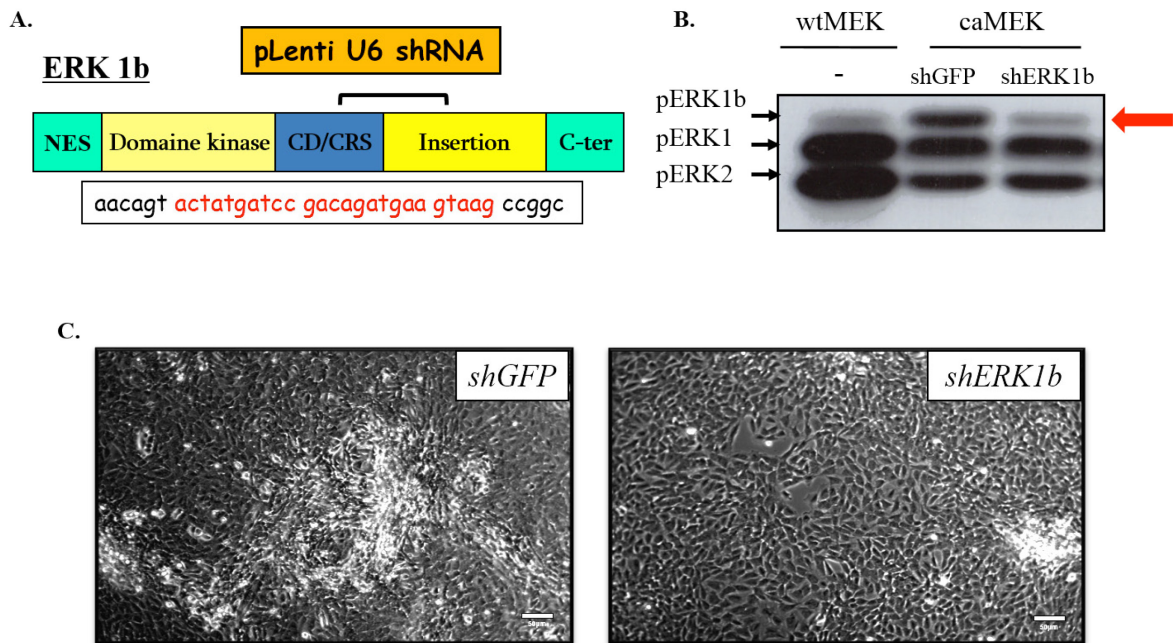
NES: Nuclear Export Signal ; CRS/CD: Cytoplasmic Retention Sequence/Common Docking domain; C-ter: extrémité C-terminale.

Généré à partir des informations de Aebersold et al., 2004; Yung et al., 2000



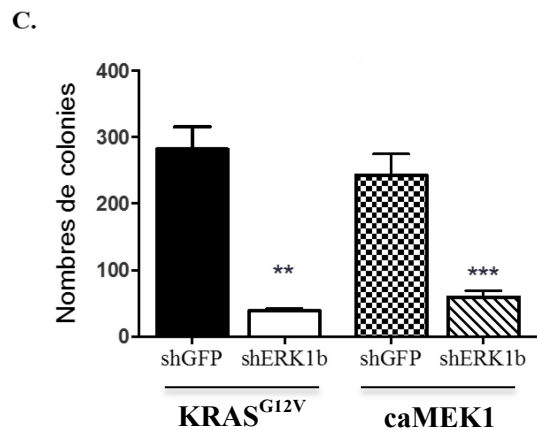
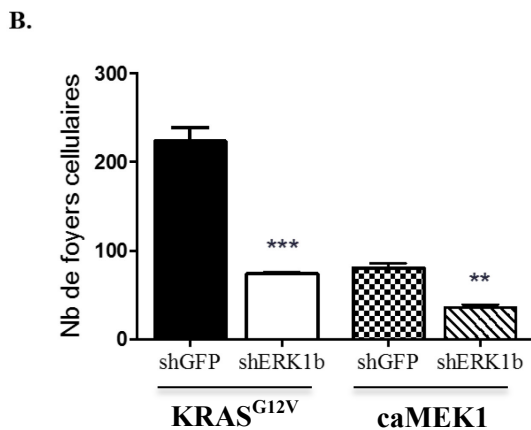
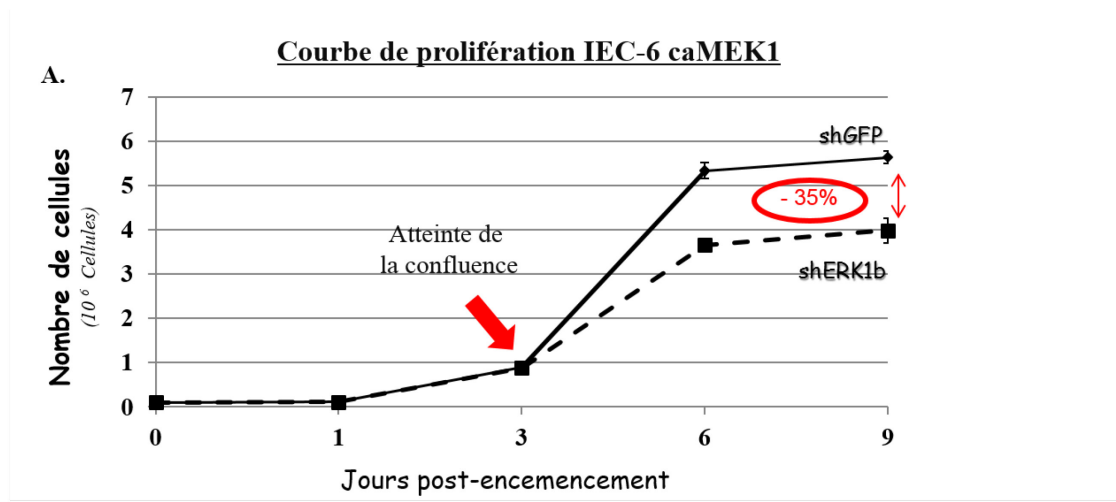
Annexe IV : Effet de l'expression des formes oncogéniques de KRAS et de MEK1 sur la phosphorylation des kinases ERK1/2.

Les cellules épithéliales intestinales IEC-6 exprimant les formes oncogéniques de KRAS et de MEK1 (caMEK1) et leurs contrôles exprimant un vecteur vide (pBabe) ou la forme sauvage de MEK1 (wtMEK) ont été lysées à sous-confluence et les protéines ont été séparées sur gel SDS-PAGE 10%. L'expression des formes phosphorylées (pERK) et totales des ERK a été évaluée par immunobuvardage (N=3).



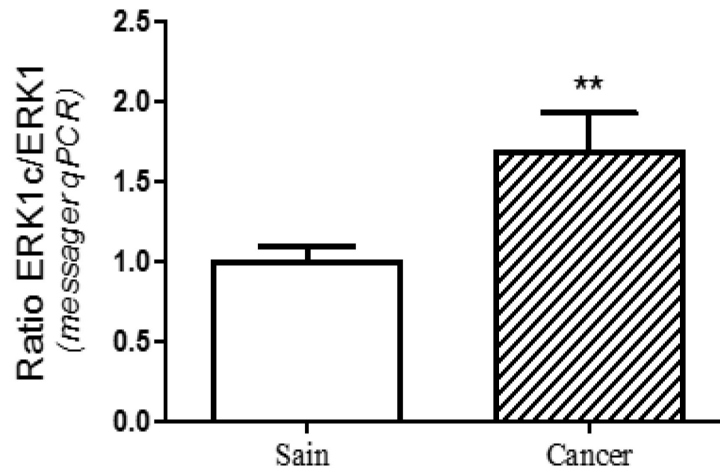
Annexe V : Impact de la baisse d'expression de ERK1b dans les cellules IEC-6 transformées par l'activation constitutive de MEK1.

A) Stratégie utilisée pour cibler spécifiquement l'isoforme ERK1b par ARN interférence. Une séquence unique à ERK1b (chevauchant le domaine de l'insertion ERK1b et une portion de la séquence homologue à ERK1et ERK1b) a été insérée dans un vecteur lentiviral (pLentiU6_shRNA). **B)** Les cellules transformées par le mutant caMEK1 ont été infectées avec des lentivirus exprimant un shARN dirigé contre ERK1b ou un shcontrôle (shGFP). Après sélection, l'expression des isoformes phosphorylées des ERKs a été vérifiée par immunobuvardage. **C)** Photographies représentatives en contraste de phase des cellules générées tel que décrit en **B)**.



Annexe VI : Contribution d'ERK1b à la transformation cellulaire induite par l'activation oncogénique de la voie KRAS/MAP kinase.

Les cellules transformées par le mutant caMEK1 ont été infectées avec des lentivirus exprimant un shARN dirigé contre ERK1b ou un shcontrôle (shGFP). **A)** Courbes de prolifération. **B)** Les cellules ont été cultivées à post-confluence pendant 10 jours. Les foyers cellulaires ont été colorés au crystal violet (1%) et dénombrés à l'aide du logiciel ImageJ. **C)** Les cellules ont été ensemencées en indépendance d'ancrage (Agarose mou) pendant 21 jours. Les foyers cellulaires ont été colorés au MTT (0,5 mg/ml) et dénombrés à l'aide du logiciel ImageJ. ** p< 0,01; *** p< 0,001



Annexe VII : Expression relative d'ERK1c, en comparaison avec ERK1, dans des tumeurs colorectales humaines.

L'expression relative d'ERK1 et d'ERK1c (normalisée sur β 2MIC et PBGD) a été analysée par PCR quantitatif dans des tumeurs colorectales humaines en comparaison avec leur marge adjacente saine. L'expression relative de ERK1c en comparaison à ERK1 a été exprimée sous forme de ratio standardisé à 1 pour la moyenne des tissus sains.

N=33; ** $p < 0,01$.