HAL
open science

Signalisation pro-apoptotique des récepteurs à dépendance UNC5H et tumorigenèse

Céline Guenebeaud

To cite this version:

Céline Guenebeaud. Signalisation pro-apoptotique des récepteurs à dépendance UNC5H et tumorigenèse. Sciences agricoles. Université Claude Bernard - Lyon I, 2010. Français. NNT : 2010LYO10035 . tel-00705380

HAL Id: tel-00705380

https://theses.hal.science/tel-00705380

Submitted on 7 Jun 2012

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

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

N° d'ordre 35-2010 Année 2010

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Délivrée par

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

Et L'ECOLE DOCTORALE BMIC

Pour l'obtention du

DIPLOME DE DOCTORAT

(arrêté du 7 août 2006)

présentée et soutenue publiquement le 12 Mars 2010

par

Céline GUENEBEAUD

Signalisation pro-apoptotique des récepteurs à dépendance UNC5H et tumorigenèse

Directeur de thèse : Agnès BERNET
Directeur d'unité : Patrick MEHLEN

JURY :

Patrick AUBERGER.....*(rapporteur)*
Olivier MICHEAU.....*(rapporteur)*
André-Patrick ARRIGO.....*(président du jury)*
Marc BILLAUD.....*(membre du jury)*
Olivier HERMINE.....*(membre du jury)*
Patrick MEHLEN.....*(membre invité)*
Agnès BERNET.....*(directrice de thèse)*

Résumé

Les récepteurs à dépendance constituent une nouvelle classe de récepteurs à activité pro-apoptotique capables en présence de leur ligand de transduire un signal de survie cellulaire et à l'inverse, en absence de ligand d'induire l'apoptose. Parmi ces récepteurs, la famille des récepteurs UNC5H et leur ligand la Nétrine-1 (i.e. UNC5H1-4) sont plus particulièrement impliqués dans la morphogenèse des organes branchés, l'angiogenèse et le guidage axonal mais aussi dans le contrôle de la tumorigenèse et de l'homéostasie. En effet, ces récepteurs et leur ligand seraient capables de contrôler la prolifération et la survie cellulaire car le ligand induirait un état de dépendance des cellules exprimant les récepteurs UNC5H.
Nous avons pu mettre en évidence un mode particulier de dérégulation tumorigène de la signalisation apoptotique des récepteurs UNC5H : la surexpression de Nétrine-1. Nous avons que l'acquisition de cette surexpression par les cellules tumorales constitue un réel avantage sélectif car cette surexpression permet aux cellules tumorales de s'affranchir de leur dépendance à la Nétrine-1 et ainsi de former des tumeurs voire de former des métastases.
Dans un deuxième temps, nous avons étudié la signalisation apoptotique des récepteurs UNC5H grâce à un crible d'ARNinterférence et 47 nouveaux effecteurs potentiels de l'apoptose sont actuellement en cours de caractérisation. Parmi eux, le complexe PP2A/PR65β a été caractérisé comme essentiel à l'apoptose induite par le récepteur à dépendance UNC5H2 et plus particulièrement dans la régulation de l'angiogenèse médiée par le couple UNC5H2/Nétrine-1.

Summary

Dependence receptors are a new class of pro-apoptotic receptor able to induce a survival signal in presence of their ligand and, on the opposite site to induce apoptosis in abaence of their ligand. Among them, UNC5H receptors (i.e UNC5H1-4) and their ligand Netrin-1 are implicated in morphogenesis of branched organs, angiogenesis and nervous system development but also in tumorigenesis control and homeostasis regulation. Indeed, this couple of ligand/receptors could control proliferation and cell survival by inducing a state of cellular dependance to the ligand presence for cell expressing UNC5H receptors.
First, we have discovered a particular tumorigenic inhibition of UNC5H apoptotic activity due to Netrin-1 overexpression by tumor cells. In this context we have shown that this overexpression is a selective advantage for tumor cells as they loss their dependence to Netrin-1 and could (i) survive and proliferate without any ligand limitation and could also (ii) migrate and form metastasis.
In a second part, we started to study UNC5H apoptotic pathway using and RNAi screening and 47 new potential effectors have been identified. Among them, PR65β/PP2A complex have been characterised as an essential actor of UNC5H2 induced apoptosis through the regulation of DAP-kinase by phosphorylation and particularly in angiogenesis regulation mediated by UNC5H2/Netrin-1.

Table des matières

Introduction 3

Chapitre I : Les voies de signalisation apoptotiques intrinsèques et extrinsèques et les thérapies anti-cancéreuses associées 7

I. Les traits communs des voies apoptotiques : les caspases 7

A. Définition et structure : 7

B. Les caspases initiatrices (2, 8, 10 et 9) 7

C. Les caspases effectrices (3, 6, 7) 8

D. Les autres protéases pro-apoptotiques 10

E. Régulateurs centraux de l'activité des caspases : IAP et Smac/Diablo 10

II. Modalité de formation du DISC : voie extrinsèque ou voie des récepteurs de mort 11

A. La superfamille des récepteurs au TNF et leur ligand 11

B. Les DISC 12

C. Importance des rafts dans l'activation des pro-caspases 8/10 13

D. Rôle physiologique des récepteurs de mort 13

1. Maturation et fonctionnement du système immunitaire 13
2. Contrôle de la tumorigenèse : Fas et TRAIL-R1/2 14
3. Fonctions indépendantes du système immunitaire 14

III. La voie mitochondriale ou voie intrinsèque 15

A. Les stimuli induisant cette voie 15

B. De la voie extrinsèque à la voie intrinsèque : rôle des protéines Bcl-2 15

C. Rôle de la voie intrinsèque 16

IV. Régulateurs généraux de l'apoptose 16

A. Le cas particulier de l'apoptose caspase-indépendante 17

B. Protéines régulatrices de la voie extrinsèque 18

1. Le rôle des Decoy Receptor 18
2. Protéines régulatrices à domaine DED 19
3. Les protéines accessoires régulatrices du DISC 20

C. Régulation de la voie intrinsèque et de l'activité des caspases 20

1. Protéines régulatrices des caspases : les IAPs 20
2. Protéines kinases régulatrices des caspases : 20
3. Les protéines chaperones 21

22

D. Régulateurs généraux de l'apoptose 22

1. Rôle des ROS et du NO 22
2. Rôle des protéines kinases Akt et MAPK 22
3. Rôle central des complexes PP2A 24

V. Déséquilibre des voies intrinsèque et extrinsèque et thérapies anti-tumorales ciblées

A. Dérégulations principales observées dans les cancers 25

B. Thérapies anti-cancéreuses : généralités 26
1. Classification 26
2. Les différents types de thérapies ciblées 26

C. Thérapies ciblées induisant directement l'apoptose des cellules cancéreuses 29
1. Les avancés majeures sur TRAIL et ses agonistes 29
2. Les antagonistes des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 30

Chapitre II : Signalisation pro-apoptotique des récepteurs à dépendance : de nouvelles perspectives thérapeutiques ?

I. La famille des récepteurs à dépendance 32

A. $P75^{NTR}$ le membre commun aux récepteurs de mort et récepteurs à dépendance 32

B. Les autres récepteurs à dépendance 33

II. Signalisation des récepteurs à dépendance 34

A. Points communs des récepteurs à dépendance : les étapes de leur signalisation apoptotique 34
1. Chronologie de l'induction de l'apoptose par les récepteurs à dépendance 34
2. Définition et structure des domaines ADD 35
3. Activation des caspases par les domaines ADD 35

B. Régulation du switch survie cellulaire/apoptose 36
1. Régulation par oligomérisation 37
2. Régulation par la localisation dans les rafts 37
3. Régulation par modification conformationnelle du récepteur 37
4. Régulation par phosphorylation 38

III. La Nétrine-1 et ses récepteurs : structures et signalisations induites par les récepteurs DCC et UNC5H 39

A. Structure des récepteurs à la Nétrine-1 et de leur ligand 39
1. Structure de la Nétrine-1 39
2. Les récepteurs à dépendance à Nétrine-1 40
3. Les autres récepteurs à la Nétrine-1 41

B. Signalisation positive des récepteurs DCC et UNC5H en présence de Nétrine-1 42
1. Voie des protéines kinases 42
2. Voie d'activation des RhoGTPases 43
3. Modulation du taux de calcium cytosolique 44

C. Signalisation pro-apoptotique des récepteurs DCC et UNC5H en absence de Nétrine-1 45
1. Signalisation pro-apoptotique du récepteur DCC 45
2. Signalisation pro-apoptotique des récepteurs UNC5H 45

D. Régulation de la signalisation induite par UNC5H et DCC 47
1. Régulation de leur fonction par phosphorylation et localisation 47
2. Régulation de l'expression des protéines DCC, UNC5H et Nétrine-1 47

IV. Rôle physiologique des récepteurs UNC5H, DCC et de leur ligand la Nétrine-1 au cours du développement du système nerveux et vasculaire 48

A. Rôle de la Nétrine-1 et de ses récepteurs dans le développement et le maintien du système nerveux : 49
1. Rôle des récepteurs à dépendance DCC et UNC5H et de la Nétrine-1 dans le guidage axonal et la survie neuronale. 49
2. Rôle accessoire des autres récepteurs à la Nétrine-1 dans le guidage axonal et la survie neuronale. 52

B. Rôle de la Nétrine-1 et du récepteur UNC5H2 et DCC dans l'angiogenèse 53

V. Les récepteurs UNC5H, DCC et leur ligand la Nétrine-1 : implication dans la morphogénèse tissulaire et la régulation de l'homéostasie 54

A. Rôles de la Nétrine-1 dans la morphogenèse de l'oreille interne, de la glande mammaire et du pancréas 54
1. Rôle de la Nétrine-1 dans la mise en place de l'oreille interne 55
2. Néogénine et Nétrine-1 dans la glande mammaire 55
3. Rôle de la Nétrine-1 dans le pancréas 56

B. Rôle de la Nétrine-1 et de ses récepteurs DCC et UNC5H dans la morphogenèse, l'adhésion et l'homéostasie 56
1. Nétrine-1 et -4 et UNC5H2 dans le poumon 56
2. UNC5H2 et Nétrine-1 dans le rein 58
3. Rôle d'UNC5H2, DCC et de la Nétrine-1 dans la peau et l'os 58

C. Fonction suppresseur de tumeur des récepteurs DCC et UNC5H 59
1. Le rôle de suppresseur de tumeur de DCC et du récepteur UNC5H3 dans le colon 59
2. De l'inflammation aux cancers : implication de la Nétrine-1 61

VI. Perte de la fonction pro-apoptotique des récepteurs à dépendance à et cancers 62

A. Perte d'expression ou mutation des récepteurs UNC5H et DCC 62

B. Perte de fonction des partenaires pro-apoptotiques 63

C. Surexpression de Nétrine-1 63

Chapitre III : Objectifs de thèse 66

Résultats 67
Article 1 68
Article 2 71
Article 3 76
Article 4 79
Article 5 82

Discussion 86

Conclusion 102

Bibliographie 105

Annexes

L'apoptose est un phénomène de mort cellulaire essentiel au bon fonctionnement d'un organisme. En effet, au cours du développement embryonnaire, l'apoptose intervient dans la morphogenèse en permettant l'élimination des cellules surnuméraires telles que les cellules des espaces interdigitaux chez l'Homme ou bien encore les cellules présentes dans la future lumière des organes creux comme les vaisseaux sanguins. Chez l'adulte, l'apoptose permet de maintenir l'intégrité de l'organisme en éliminant toute cellule présentant un danger potentiel celui-ci : cellules infectées par des microorganismes ou bien encore cellules présentant des dommages irréparables au niveau protéique ou ADN. Ce rôle de « surveillance de l'organisme » est souligné par le fait que les dérégulations de l'apoptose sont à l'origine de pathologies graves. En effet, l'absence d'apoptose peut être à l'origine des cancers : les cellules ayant perdu leur aptitude à mourir accumulent les dommages à l'ADN liés aux agressions environnementales ce qui favorise la mutagenèse et donc la transformation tumorale. Afin de développer des traitements anti-cancer, il est indispensable de comprendre les mécanismes intracellulaires conduisant à l'apoptose et leur inhibition en condition tumorale.

A l'heure actuelle, on distingue 3 grands types de signalisation capables d'induire l'apoptose : la voie mitochondriale, la voie des récepteurs de mort et enfin la voie des récepteurs à dépendance plus récemment décrite. Ces 3 signalisations se distinguent par les principaux stimuli qui les induisent qui sont respectivement la perforation de la membrane mitochondriale, la fixation d'un ligand sur les récepteurs de mort ou bien au contraire l'absence de ligand sur les récepteurs à dépendance. En dehors de cette initiation de l'apoptose différente pour les trois mécanismes, ces trois voies déclenchent des cascades de signalisation présentant des effecteurs spécifiques mais aussi des effecteurs communs. En effet, le point commun à l'ensemble des voies de signalisation pro-apoptotique est l'activation de protéases particulières, les caspases, qui vont cliver de nombreux substrats cellulaires aboutissant *in fine*, à la dislocation des cellules en corps apoptotiques, sortes de vésicules englobant le contenu cellulaire. *In vivo*, ce processus est totalement « silencieux » : il n'induit pas de réaction inflammatoire car les corps apoptotiques englobent le contenu cellulaire et sont éliminés grâce aux macrophages par phagocytose.

Les premières thérapies ciblées anti-cancéreuses ont été développées sur la base de la signalisation des récepteurs de mort dérégulée dans certains cancers. Un exemple est l'utilisation d'une protéine agoniste de TRAIL (*TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand*), le ligand des récepteurs de mort TRAIL-R1 et R2, pour forcer la mort des cellules tumorales. En effet, il a été montré que certaines tumeurs expriment fortement les récepteurs de TRAIL au

contraire des cellules normales et que leur traitement par ces agonistes en combinaison ou non avec une radiothérapie induit une apoptose des cellules tumorales *in vitro* (Marini et al., 2009; Sheridan et al., 1997). Toutefois, la plupart des tumeurs se sont avérées résistantes à ces agonistes parce qu'elles expriment des récepteurs leurres ou « decoy receptor » : TRAIL-R3 et TRAIL-R4 (Sanlioglu et al., 2007; Sheikh et al., 1999). Ces leurres ont la même affinité que TRAIL-R1 et TRAIL-R2 pour TRAIL (ou ses agonistes) mais n'ont aucune activité pro-apoptotique car ils sont dépourvus de domaine intracellulaire – domaine indispensable à la transduction du signal apoptotique. Ainsi, ces récepteurs leurres titrent les agonistes de TRAIL et protègent les cellules tumorales de l'apoptose. Il est donc indispensable de mieux décrire l'ensemble des voies de signalisation apoptotiques pour trouver de nouvelles cibles thérapeutiques et améliorer l'efficacité des traitements actuels. A ce jour, les acteurs impliqués dans la voie mitochondriale et la voie des récepteurs de mort sont bien décrits ce qui n'est pas le cas pour la voie des récepteurs à dépendance.

Notre laboratoire s'intéresse à la voie de signalisation pro-apoptotique la moins caractérisée et qui pourrait donc offrir de nouvelles perspectives de traitement : la voie des récepteurs à dépendance. Parmi eux, les récepteurs DCC (*Deleted in Colorectal Carcinoma*) et la famille des récepteurs UNC5H (*Uncoordinated 5 Homologous*) -composée des membres UNC5H1, UNC5H2, UNC5H3 et UNC5H4- qui fixent tous le même ligand la Nétrine-1, présentent un intérêt tout particulier car il a été montré qu'ils avaient un rôle dans le contrôle de la tumorigenèse. En effet, les études menées dans notre laboratoire ont révélé que la perte de fonction apoptotique des récepteurs à dépendance DCC et UNC5H3 par LOH (*Loss Of Heterozygoty*), par méthylation du promoteur ou bien par surexpression de leur ligand la Nétrine-1 étaient des éléments prédisposant retrouvés dans les cancers du colon et prédisposant également à la tumorigenèse intestinale/colorectale chez la souris (Bernet et al., 2007; Mazelin et al., 2004; Paradisi et al., 2009; Thiebault et al., 2003). Ces observations ont conduit le laboratoire à s'intéresser à l'expression et au rôle des récepteurs DCC, UNC5H et de la Nétrine-1 dans les autres cancers humains.

Dans un objectif thérapeutique visant à restaurer l'apoptose induite par les récepteurs DCC et UNC5H dans les cellules cancéreuses, nous avons cherché à identifier les cancers présentant une dérégulation de la mort liée à une surexpression de la Nétrine-1. En effet, l'avantage des récepteurs à dépendance est que le ligand jouant le rôle de facteur de survie tumoral, est accessible et donc plus facile à cibler en comparaison avec les récepteurs à dépendance souvent mutés ou perdus.

Alors que seulement 10% des patients atteints de cancers colorectaux présentent un gain de Nétrine-1, la plupart des cancers du sein métastatique, des cancers pulmonaires non à petites cellules et des neuroblastomes de stade 4 sont concernés (Delloye-Bourgeois et al., 2009a; Delloye-Bourgeois et al., 2009b; Fitamant et al., 2008). Dans ces tumeurs, nous avons montré que l'on pouvait bloquer la Nétrine-1 et ainsi rétablir efficacement les voies de signalisation pro-apoptotique induites par les récepteurs à dépendance DCC et UNC5H.

En parallèle, nous nous sommes également intéressés à l'identification des acteurs des voies de signalisation permettant aux récepteurs UNC5H et DCC d'induire l'apoptose et donc d'exercer leur rôle dans le contrôle de la tumorigenèse, ces acteurs pouvant devenir des nouveaux marqueurs ou de nouvelles cibles pour des thérapies anti-cancer.

Dans ce mémoire je détaillerai dans une première partie bibliographique le fonctionnement de l'ensemble des voies pro-apoptotiques : voie mitochondriale, voie des récepteurs de mort et plus largement celle des récepteurs à dépendance. Je décrirai les dérégulations de ces voies associées aux cancers et les premières thérapies ciblées développées. Dans une deuxième partie je présenterai les résultats que j'ai obtenus au cours de ma thèse. Un premier chapitre sera consacré à l'étude du rôle de la Nétrine-1 dans les cancers mammaires et pulmonaires et au développement d'une nouvelle thérapie ciblée utilisant un peptide leurre capable de titrer la Nétrine-1. Un second chapitre sera axé sur la partie principale de mon travail qui a consisté à caractériser par un crible ARN interférence d'autres acteurs impliqués dans les voies de signalisation pro-apoptotique des récepteurs à Nétrine-1 UNC5H. J'exposerai les résultats obtenus grâce à ce crible et notamment la mise en évidence de la protéine phosphatase PP2A, initialement décrite pour réguler la voie mitochondriale et la voie induite par les récepteurs de mort. Je montrerai comment nous avons caractérisé le rôle essentiel de PP2A dans la signalisation pro-apoptotique du récepteur UNC5H2 et vérifié la relevance de ce résultat *in vitro* et *in vivo*. Enfin, je discuterai l'ensemble de ces résultats et exposerai les perspectives qui en découlent en termes de compréhension des voies de signalisation pro-apoptotique et de thérapies.

Chapitre I : Les voies de signalisation apoptotiques intrinsèques et extrinsèques et les thérapies anti-cancéreuses associées

I. Les traits communs des voies apoptotiques : les caspases

A. Définition et structure :

La caractéristique majeure de l'apoptose est l'activation de protéases à cystéines : les caspases (*Cysteine-dependent ASPartate-specific proteASE*). Ces enzymes sont capables de cliver leur substrat protéique après un acide aspartique inclus dans un motif de 4 acides aminés. La famille des caspases comprend des membres pro-apoptotiques (caspases 2, 3, 6, 7, 8, 9 et 10) ainsi que des membres pro-inflammatoires (caspases 1, 4, 5, 11 et 12) que nous ne traiterons pas ici – pour revue (Pop and Salvesen, 2009).

Les caspases peuvent être classées en deux catégories selon leur structure, leur chronologie d'activation au cours de l'apoptose, leur mode d'activation et leur substrat : les caspases initiatrices et les caspases effectrices (**figure 1**).

En absence de stimulus pro-apoptotique, les caspases sont présentes dans le cytoplasme à l'état de procaspase (ou zymogène) avec une activité réduite. Ces procaspases sont constituées d'un domaine court : p10, d'un domaine long : p20 et d'un prodomaine dont la longueur est variable. En effet, alors que le prodomaine des procaspases effectrices est très court et ne comporte pas de domaine particulier, le prodomaine des procaspases initiatrices comporte des domaines nécessaires à leur recrutement et à leur activation au sein de complexes pro-apoptotiques : un domaine CARD (*CAspase Recruitment Domain*) ou deux domaines DED (*Death Effector Domain*) (**figure 1**).

B. Les caspases initiatrices (2, 8, 10 et 9)

La famille des caspases initiatrices comporte les caspases 2, 8, 10 et 9. Les caspases initiatrices sont activées précocement au cours de l'apoptose dans des complexes protéiques spécifiques à différents stimuli apoptotiques : le DISC (caspases 8, 10 et 2), le PIDDosome (caspase 2), et l'apoptosome (caspase 9) (**figure 2**).

Le **DISC** (*Death Inducing Signaling Complex*) se forme suite à la fixation du ligand sur les récepteurs de mort transmembranaires. Les récepteurs de mort vont alors recruter par

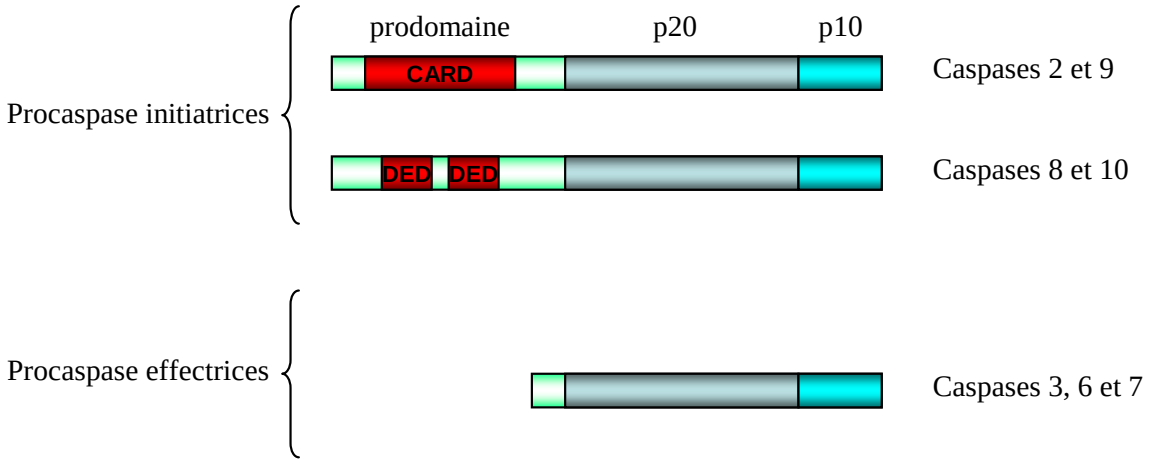


Figure 1 : Structure et classification des procaspases

Les caspases initiatrices et effectrices ont des structures différentes et se distinguent par leur prodomaine qui peut être très court et dépourvu de domaine particulier (procaspases effectrices), ou bien munit d'un domaine CARD ou de deux domaines DED (procaspases effectrices).

interaction homotypique via leur domaine de mort ou « *Death Domain* » (DD), de nombreuses protéines adaptatrices dont la protéine FADD (*Fas Associated Death Domain*) qui va à son tour recruter au sein du DISC les procaspase 8 et 10 via leur domaine DED (Schraven and Peter, 1995) (**figure 2**).

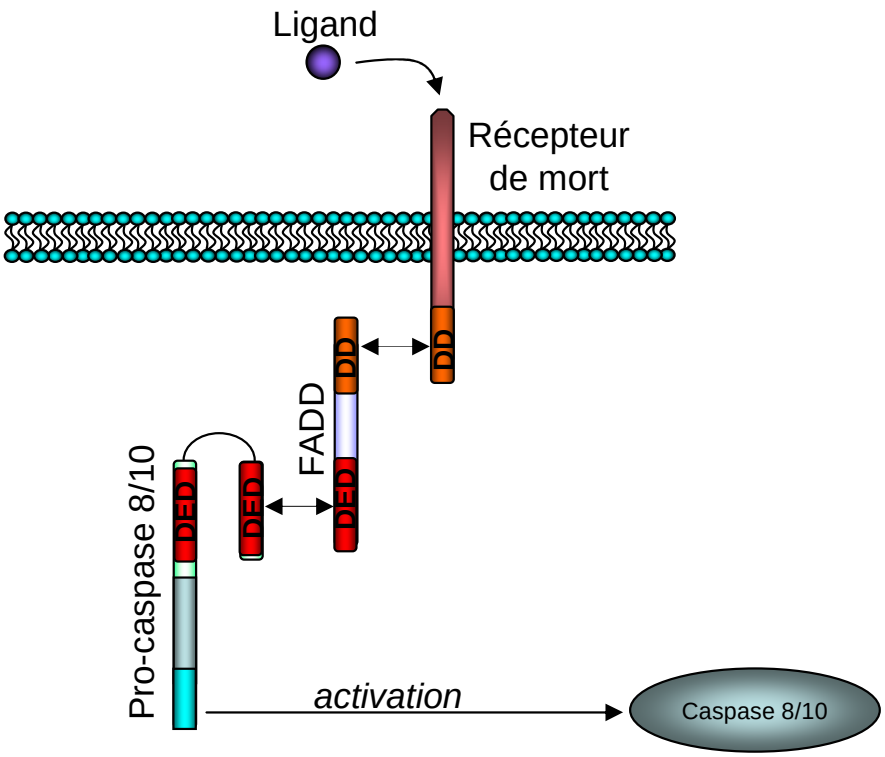
Le **PIDDosome** se forme dans le cytosplasme suite à des dommages à l'ADN et est constitué des protéines PIDD (*P53 Induced Protein with a Death Domain*) et RAIDD (*RIP associated protein with a Death Domain*) (**figure 2**). Ces deux protéines interagissent entre elles via leur domaine de mort et RAIDD permet le recrutement de la procaspase 2 par interaction entre leurs domaines CARD respectifs (Tinel and Tschopp, 2004). Ce modèle d'activation de la caspase 2, responsable de la mort des cellules ayant subit des dommages à l'ADN, a été remis en cause récemment par l'inactivation par recombinaison homologue (Knock Out) de PIDD réalisé chez la souris. En effet, les souris PIDD$^{-/-}$ ne présentent pas de déficiences particulières. En outre, l'activation de la caspase 2 après irradiation est similaire entre les cellules de différents tissus PIDD$^{-/-}$ et les cellules sauvages. Il existe donc un mécanisme d'activation de la caspase 2 PIDDosome indépendant (Manzl et al., 2009). De manière intéressante, il a récemment été montré que des dommages à l'ADN via l'induction de p53 peuvent également entraîner la formation d'un DISC impliquant le récepteur de mort Fas indépendamment de son ligand. P53 activerait le gène *fas* et cette néoproduction permettrait la formation d'un DISC particulier permettant le recrutement et l'activation de la caspase 8 mais aussi de la caspase 2 (Olsson et al., 2009). Il semble donc que le PIDDosome et le DISC participent à l'activation de la caspase 2 en cas de dommages à l'ADN.

L'apoptosome quant à lui se forme suite à la perforation de la membrane mitochondriale entraînant la libération cytosolique du cytochrome C. Ce dernier va s'associer à la protéine Apaf-1 formant un complexe heptamèrique (constitué de 7 sous-unités similaires) permettant le recrutement d'ATP et de la procaspase 9 (Yu et al., 2005) (**figure 2**).

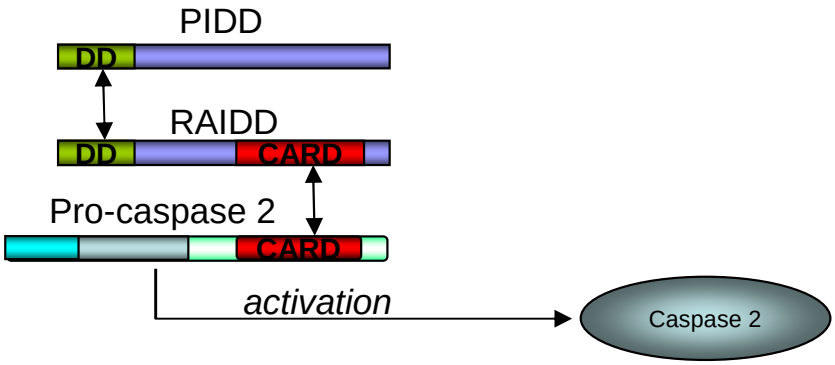
Dans ces 3 complexes, la modalité d'activation des procaspases 2, 8/10 et 9 n'est pas claire. Une hypothèse est que les procaspases n'ont pas une activité totalement nulle et que leur concentration locale suffit à entraîner leur activation (activation allostérique). Elles peuvent être clivées (activation par protéolyse) mais ce n'est de manière générale pas un mécanisme indispensable à leur activation. En effet, la caspase 2 a la même activité sous sa forme zymogène que sous sa forme mâture au sein du PIDDosome (Tinel and Tschopp, 2004).

C. Les caspases effectrices (3, 6, 7)

Le DISC



Le PIDDosome



L'Apoptosome

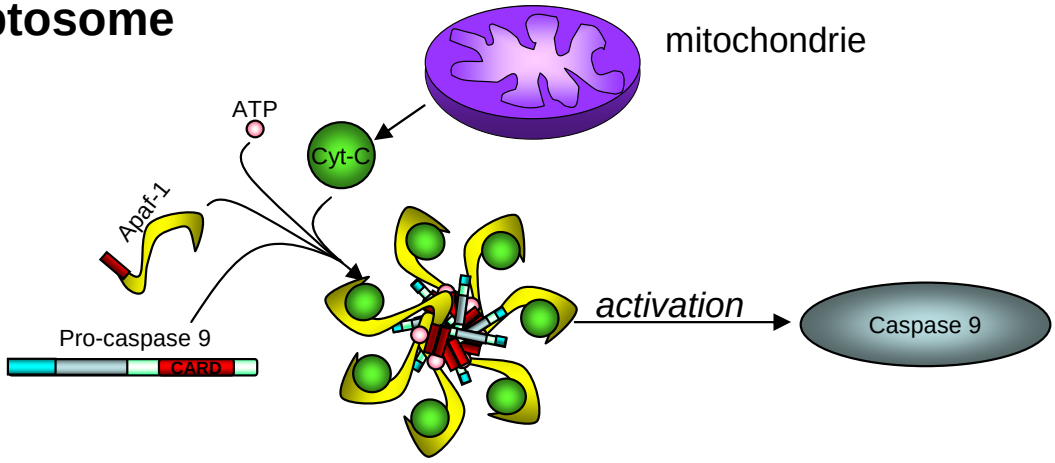


Figure 2 : Les complexes d'activation des caspases initiatrices

Les caspases initiatrices 2, 8, 9 et 10 sont activées au sein de trois complexes différents. Les caspases 8 et 10 sont activées par le Death Inducing Signaling Complex ou DISC, la caspase 2 est activée par le PIDDosome et enfin la caspase 9 est activée grâce à la formation d'un complexe heptamérique l'apoptosome.

Les caspases initiatrices actives vont activer à leur tour la seconde famille de caspases : les caspases effectrices (caspases 3, 6 et 7). Ces dernières peuvent être activées par clivage et dimérisation de manière directe via l'intervention de la caspase initiatrice 9 ou bien indirectement après induction de la voie mitochondriale par la caspase 2 via le clivage de protéines mitochondriales appartenant à la famille Bcl-2 (voir paragraphe III.B. p15) (**figure 3**). Les caspases 8 et 10 quant à elles sont capables selon le type cellulaire d'activer directement les caspases effectrices (dans les cellules dites de type I telles que les lymphocytes) ou bien d'activer préalablement la voie mitochondriale via le clivage de protéines de la famille Bcl-2 (dans les cellules dites de type II telles que les hépatocytes et les cellules ß pancréatiques) (Kaufmann et al., 2007; McKenzie et al., 2008; Scaffidi et al., 1998; Yin et al., 1999). Deux hypothèses peuvent expliquer la différence d'activation des caspases 8 et 10 entre les cellules de type I et les cellules de type II. (i) Un recrutement faible de la protéine FADD dans les cellules de type II, aurait pour conséquence une activation des procaspases 8/10 insuffisante à l'induction directe des caspases effectrices. L'induction de la voie mitochondriale par les caspases 8/10 jouerait le rôle d'amplificateur intermédiaire en permettant la formation de l'apoptosome et l'activation des caspases effectrices par la caspase 9 (Scaffidi et al., 1998). (ii) Une étude plus récente suggère qu'une protéine inhibitrice de l'activité des caspases : XIAP (mécanisme d'action détaillé dans le paragraphe I.E, p10), est responsable de la différence d'activation des caspases effectrices entre les cellules de type I et de type II. La protéine XIAP est exprimée de manière similaire dans les deux types cellulaires, cependant suite à l'induction de la voie des récepteurs de mort une augmentation significative de XIAP associée à une inhibition partielle de l'activité des caspases 8/10 et de la caspase 3 est observée dans les cellules de type II (Jost et al., 2009). Au contraire, suite à la formation du DISC, XIAP diminue dans les cellules de type I et les caspases 8/10 et 3 sont fortement et rapidement activées. Par ailleurs, les souris déficientes pour XIAP ont des cellules hépatiques plus sensibles à l'apoptose induite par l'injection du ligand FasL en comparaison avec des souris sauvages ; alors qu'aucune différence notable de sensibilité n'apparaît entre les thymocytes des deux souches de souris. XIAP protègerait donc les cellules hépatiques contre l'apoptose médiée par les récepteurs Fas en limitant l'activation des caspases 8/10. Cette faible activité des caspases initiatrices 8/10 est insuffisante pour induire directement la caspase 3 mais suffisante pour induire la voie mitochondriale et donc pour conduire *in fine* à l'apoptose (Jost et al., 2009).

Les caspases effectrices activées, via la dégradation de différents substrats vont stopper la machinerie cellulaire (arrêt du métabolisme, du cycle cellulaire et de la différenciation) et induire l'apoptose. Leurs cibles principales interviennent dans le maintien de la structure cellulaire et sont des protéines de synthèse et de réparation de l'ADN (PARP1, DNA-PKC, Topoisomérase I, CAD), des protéines du cytosquelette (Gelsoline, Vimentine, Cytokératine 18, ROCK-1, Gas-2, Fodrine, Plectine, PAK2), des protéines de structure nucléaire (NuMa, Lamines, Mdm2, Cas), et des protéines d'adhésion cellulaire (ß-caténine, kinase d'adhésion focale) (**figure 3**). Ainsi, le clivage de l'ensemble de ces protéines par les caspases va entraîner un détachement de la cellule de la matrice extracellulaire et des cellules voisines aboutissant *in fine* à la déstructuration nucléaire et cellulaire et à la formation de corps apoptotiques (Lavrik et al., 2005).

D. Les autres protéases pro-apoptotiques

Le clivage et l'activation des caspases impliquent également des protéases accessoires : les calpaïnes et les cathepsines. Les calpaïnes seraient activées suite à un influx calcique provoqué par la dégradation des transporteurs ioniques des organelles tels que la mitochondrie au cours du processus apoptotique (Gafni et al., 2009). Les cathepsines quant à elles, sont des protéases d'origine lysosomale transloquées dans le cytosol en cas d'induction de la voie des récepteurs de mort (Foghsgaard et al., 2001). Ces deux classes de protéases ont également pour substrats les procaspases effectrices et peuvent contribuer à leur activation au cours de l'apoptose amplifiant ainsi le signal apoptotique (Gafni et al., 2009; Pratt et al., 2009).

E. Régulateurs centraux de l'activité des caspases : IAP et Smac/Diablo

Les IAPs ou *Inhibitor of Apoptosis Protein* sont des protéines inhibitrices des caspases initialement identifiées chez les baculovirus et classées en trois groupes en fonction de leur nombre de domaine BIR (*Baculoviral IAP Repeat*). La première classe composée des membres XIAP, cIAP1, cIAP2, ILP-2 and ML-IAP se caractérise par trois domaines BIR et une région en doigt de zinc. La protéine NAIP appartient à la deuxième classe d'IAP et est uniquement constituée de trois domaines BIR. Enfin, la troisième classe d'IAP est définie par un domaine BIR partiel et comprend la Survivine et BRUCE.

Il a été montré que la surexpression des IAPs était à l'origine du blocage de l'activation des caspases *in vitro* et *in vivo* (Hay et al., 1995; Salvesen and Duckett, 2002; Xue and Horvitz, 1995). Toutefois, le mécanisme responsable de cette activité anti-

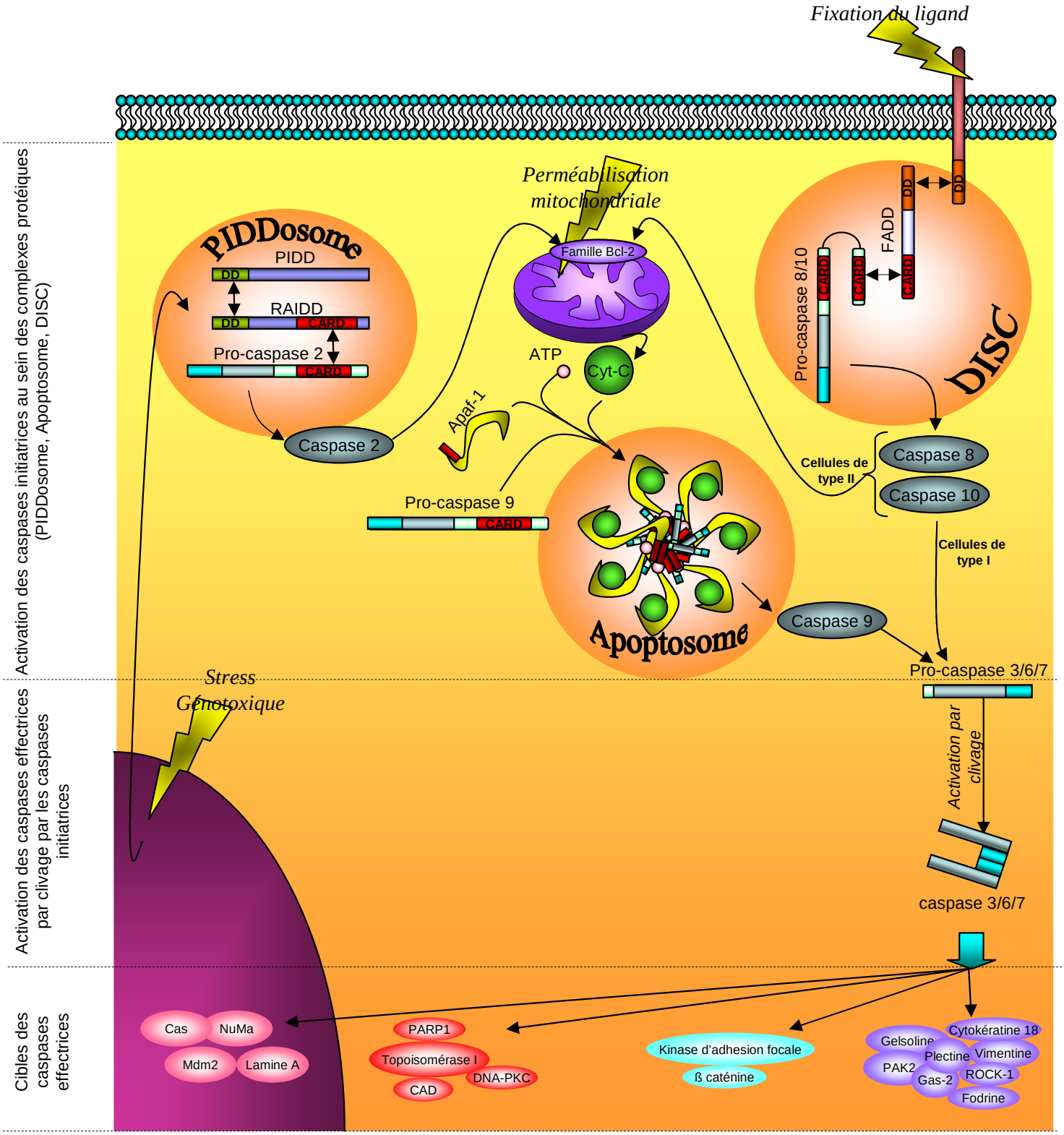


Figure 3 : Cascade d'activation des caspases

Suite à l'induction de l'apoptose par différents stimuli, les caspases initiatrices sont activées par 3 complexes distincts : Le PIDDosome en cas de stress génotoxique, le DISC après fixation du ligand sur les récepteurs de mort et l'Apoptosome suite à la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe. Les caspases 2, 8/10 et 9 actives vont à leur tour activer par clivage les caspases effectrices 3, 6 et 7 qui vont dégrader différents substrats et conduire à l'apoptose.

apoptotique est assez mal connu. Les deux IAPs les mieux caractérisées *in vitro* sont XIAP et la Survivine sans doute parce que ces deux protéines sont fréquemment surexprimées dans les cancers et présentent donc un intérêt thérapeutique particulier. Outre le rôle régulateur de XIAP dans l'apoptose médiée par les récepteurs de mort dans les cellules de type I et II (Jost et al., 2009) (voir paragraphe I.Cp9), il a été montré que la surexpression de XIAP et de la Survivine entraînait l'inhibition des caspases 3, 7 et 9 via une interaction directe entre les domaines BIR des IAPs et les procaspases (Chai et al., 2001; Shin et al., 2001). Les IAPs permettraient ainsi d'éviter une induction aspécifique de l'apoptose.

Par ailleurs, il a été montré que XIAP est capable d'interagir avec la caspase 9 clivée/active au sein même de l'apoptosome et de moduler son activité. En effet, des expériences de gel filtration confirmées par des co-immunoprécipitations révèlent que la caspase 9 active associée à Apaf-1 interagit avec XIAP. De plus, cette association avec XIAP entraîne une inhibition de l'activation en aval de la caspase 3 (Srinivasula et al., 2001). Ainsi, les IAPs contrôlent l'activation des procaspases mais sont également capables de réguler l'activité des caspases actives.

Au contraire, lorsque les cellules sont exposées à un stimulus pro-apoptotique, un dimère de protéines mitochondriales : Smac/DIABLO est libéré dans le cytosol et entre en compétition directe avec les caspases au niveau des domaines BIR des IAPs (Wu et al., 2000) (Chai et al., 2000). *In fine*, Smac/DIABLO fixe les IAPs et permet la libération des procaspases puis leur activation au sein des complexes précédemment cités. Smac/DIABLO déplace également XIAP lorsqu'elle est fixée à la caspase 9 au sein de l'apoptosome et permet ainsi l'activation des caspases effectrices.

Les deux complexes majeurs impliqués *in vitro* et *in vivo* dans l'activation des caspases sont le DISC et l'apoptosome. Nous allons nous intéresser plus particulièrement à leur modalité de formation suite à l'induction de la voie des récepteurs de mort (voie extrinsèque) et de la voie mitochondriale (voie intrinsèque).

II. Modalité de formation du DISC : voie extrinsèque ou voie des récepteurs de mort

A. La superfamille des récepteurs au TNF et leur ligand

Les récepteurs de mort appartiennent à la superfamille des récepteurs au TNF (*Tumor Necrosis Factor*) et comportent TNF-R1 (*Tumor Necrosis Factor Receptor 1*), TNF-R2, Fas,

DR3 (*Death Receptor 3*), DR6, TRAIL-R1 (*TNF Related Apoptosis Inducing Ligand Receptor 1*), TRAIL-R2, EDAR et $p75^{NTR}$ (*p75 Neurotrophin receptor*) qui sont des protéines transmembranaires de type II à activité pro-apoptotique. Par ailleurs, ces récepteurs partagent la même structure : tous sont muni d'un domaine de mort en C Terminal (à l'exception de TNF-R2) et de domaines riches en cystéines sur leur partie extracellulaire (French and Tschopp, 2003; Wajant, 2003) (**figure 4**).

Au sein de cette superfamille des récepteurs au TNF, on distingue la classe des récepteurs leurres (ou *Decoy Receptor*) composée des membres : TRAIL-R3, TRAIL-R4 et DcR3 et l'Ostéoprotégérine (OPG). Ces derniers n'ont pas de domaine intracellulaire et ne transduisent pas de signal apoptotique mais sont capables de fixer les même ligands que les récepteurs (Lavrik et al., 2005) (**figure 4**).

Les ligands des récepteurs de mort et des récepteurs leurres sont EDA1, NGF, TNF, TL1A, FasL et TRAIL. Ces ligands sont synthétisés sous une forme membranaire mais peuvent être sécrétés sous l'action de métalloprotéases (**figure 4**) (Schulte et al., 2007). Il est à noter que le ligand du récepteur DR6 n'a pas été identifié. Toutefois, il a récemment été montré que DR6 était capable d'interagir avec la partie N-terminale d'un autre récepteur transmembranaire : N-APP (*beta Amyloid Precursor Protein*) et que cette interaction était capable d'induire l'activation des caspases 3 et 6 *in vitro* et *in vivo* sur différents types cellulaires tels que les neurones commissuraux (Nikolaev et al., 2009). Les études futures montreront si la fixation de N-APP sur DR6 entraîne la formation d'un DISC à l'origine de l'activation des caspases.

B. Les DISC

Suite à la fixation du ligand, les récepteurs de mort s'homotrimérisent par interaction entre leur premier domaine N-Terminal riche en cystéine nommé PLAD (*PreLigand Assembly Domain*) et vont recruter les différentes protéines du DISC via leur domaine de mort. Les récepteurs de mort sont capables de former deux types de DISC. L'un est formé en une seule étape de recrutement (récepteurs Fas, TRAIL-R1 et TRAIL-R2) : suite à la fixation du ligand, le trimère de récepteurs recrute via ses domaines de mort la protéine FADD, les procaspases 8/10 et va permettre leur activation puis l'activation des caspases effectrices (**figure 5**).

Le second type de DISC (récepteurs TNF-R1, DR3 et DR6) se forme de manière séquentielle suite à l'association de deux séries de protéines adaptatrices formant le complexe de type I puis le complexe de type II (Lavrik et al., 2005) (**figure 5**) : après leur trimérisation

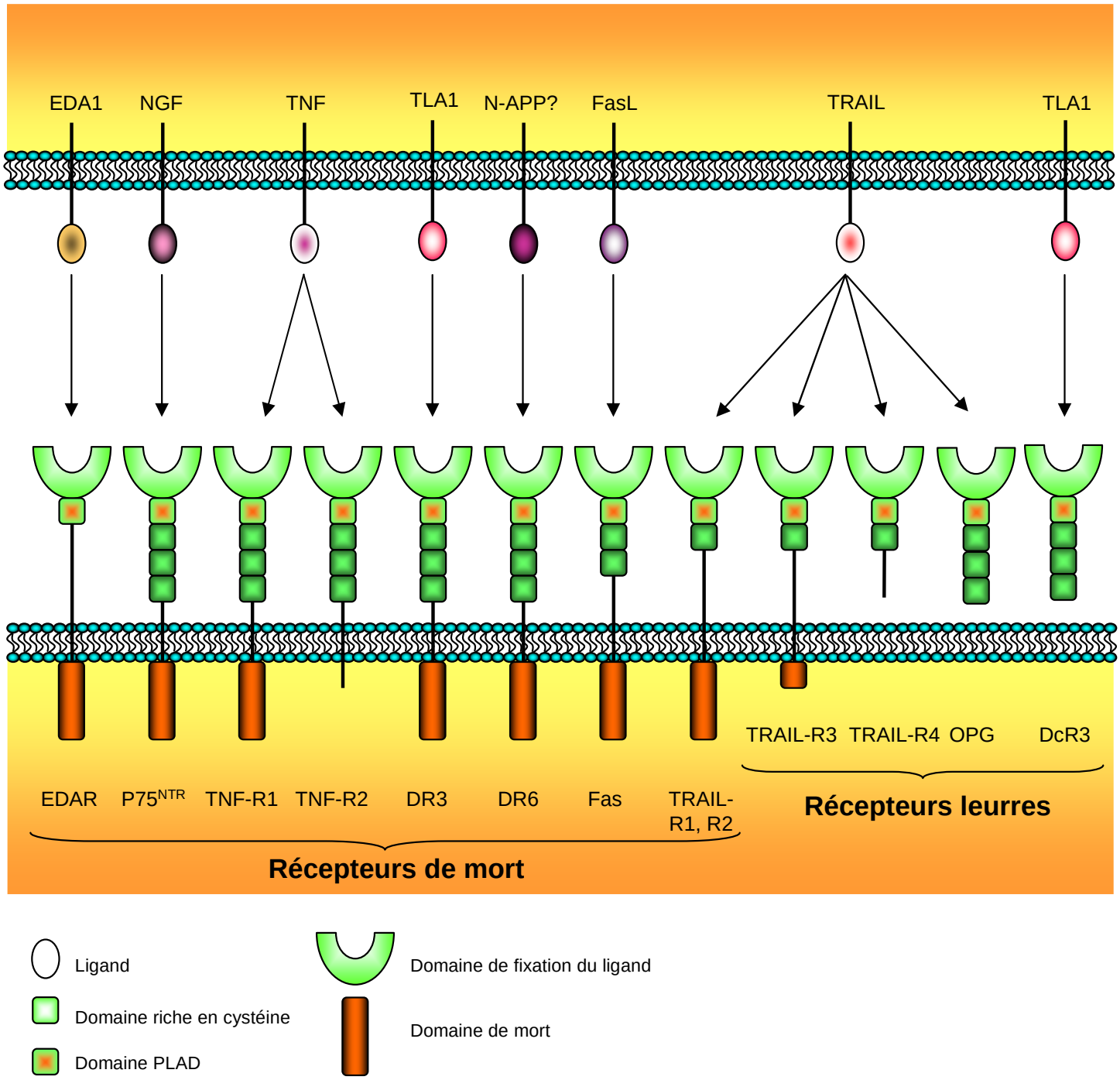


Figure 4 : Structure de la famille des récepteurs au TNF et ligands

Les récepteurs de mort sont constitués d'un domaine de fixation du ligand, de 1 à 4 domaines cystéines et d'un domaine de mort. Les ligands des récepteurs de mort peuvent exister sous deux formes solubles ou ancrés à la membrane de cellules adjacentes comme représenté ici.

les récepteurs recrutent tout d'abord via leur domaine de mort les protéines adaptatrices RIP (*Receptor Interacting Protein*), TRADD (*TNF-R Associated Death Domain protein*) ainsi que les protéines TRAF1 et TRAF2 (*TNF-R Associated Factor*). Ce complexe dit de type I est ensuite transloqué dans le cytosol où il s'associe avec FADD et les procaspases 8/10 formant le complexe de type II à l'origine de l'activation des caspases initiatrices (**figure 5**).

C. Importance des rafts dans l'activation des procaspases 8/10

Il a été montré que la translocation des DISC dans les « lipid rafts » (nommé également radeaux lipidiques et correspondants à des régions de la membrane plasmique riches en cholestérol et sphingolipides) était nécessaire à l'activation des procaspases 8/10.

En effet, il a été mis en évidence sur certains types cellulaires en culture que le trimère de TNF-R1 était, en présence de ligand, transloqué dans les rafts où il recrute les protéines adaptatrices (Lotocki et al., 2004). Par ailleurs, il a été montré que les récepteurs Fas et TRAIL-R1 étaient palmitoylés et que cette modification post-traductionnelle augmentait l'activité pro-apoptotique de ces récepteurs en induisant leur translocation dans les rafts (Rossin et al., 2009). Cette localisation des DISC formés par les récepteurs Fas et TRAIL-R1 permettraient leur internalisation dans les endosomes ce qui concentrerait localement les procaspases 8/10 permettant leur activation massive (Eramo et al., 2004) (**figure 5**).

D. Rôle physiologique des récepteurs de mort

Les récepteurs de mort n'étant pas exprimés de manière ubiquitaire, leur fonction est tissu-dépendante. Il est à noter que les récepteurs de mort ont des fonctions pro et anti-apoptotiques ce qui peut paraître contradictoire avec la définition même de ces récepteurs. Toutefois, les cellules (en particulier les cellules du système immunitaire) sont confrontées au même moment à de nombreux signaux (ceux médiés par les récepteurs de mort mais aussi tout un ensemble de signaux médié par d'autres cellules du système immunitaire tels que les Interleukines) qui vont activer ou inhiber différents régulateurs pro ou anti-apoptotiques des voies de signalisation induite par les récepteurs de mort (voir paragraphe IV p16) (Strasser et al., 2009).

1. Maturation et fonctionnement du système immunitaire

Les récepteurs de mort et leurs ligands sont importants pour la différenciation, la maturation et l'activation des leucocytes au cours de la réponse immunitaire. Néanmoins, cette fonction ne serait pas toujours liée à l'induction de l'apoptose. En effet, il a été montré

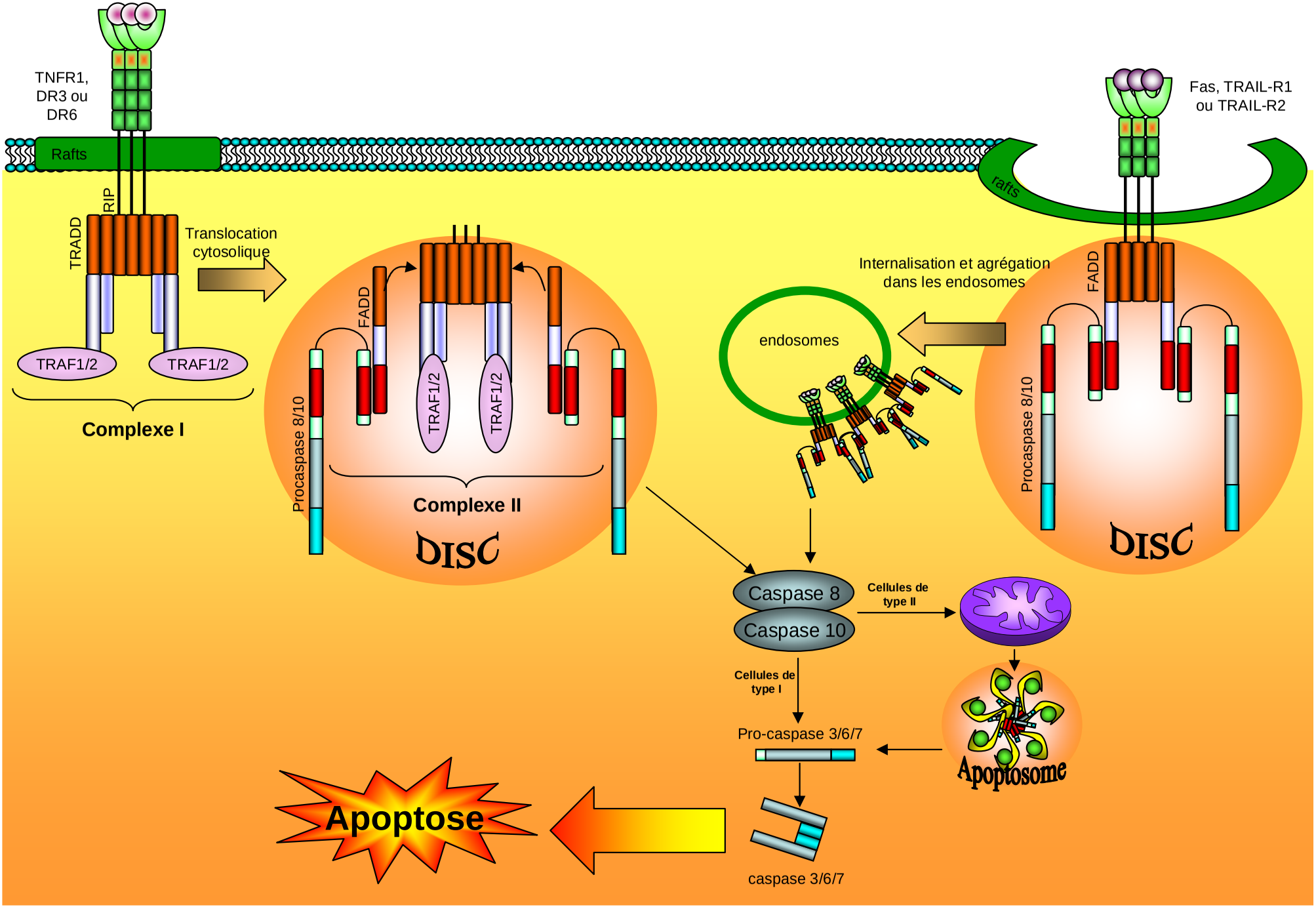


Figure 5 : Signalisation pro-apoptotique médiée par les récepteurs de mort.

En présence de leurs ligands, les récepteurs de mort recrutent différentes protéines adaptatrices dans les rafts qui après translocation cytosolique ou internalisation, vont activer les caspases initiatrices puis effectrices et conduire à l'apoptose.

que le TNF pouvait avoir un double rôle sur les cellules exprimant TNF-R1, d'une part en induisant la mort des lymphocytes auto-réactifs mais aussi d'autre part en contribuant à la prolifération et donc à l'expansion clonale, au cours d'une infection, des lymphocytes ayant acquis une spécificité antigénique conduisant à leur différenciation en lymphocytes effecteurs (Micheau and Tschopp, 2003). De manière similaire, Fas et TRAIL-R1/2 interviennent dans la maturation et la sélection des lymphocytes T et B et ont un rôle dans la réponse immunitaire cytotoxique (élimination par apoptose des cellules infectées par des parasites intracellulaires par le couple FasL/Fas). Le récepteur DR6 quant à lui est impliqué dans la maturation des cellules dendritiques (DeRosa et al., 2008). Enfin, DR3, Fas et leurs ligands respectifs TL1A et FasL sont connus pour participer à la stimulation des lymphocytes T au cours de la réponse immunitaire en agissant notamment sur les cellules dendritiques (Legge and Braciale, 2005; Migone et al., 2002).

2. Contrôle de la tumorigenèse : Fas et TRAIL-R1/2

Ces deux récepteurs auraient un rôle dans l'immunosurveillance tumorale. En effet, il a été montré que les cellules tumorales sont plus sensibles à l'apoptose médiée par TRAIL que les cellules normales (Wiley et al., 1995). De plus, les souris mutantes pour TRAIL ou Fas (Knock Out) développent plus fréquemment des tumeurs primaires et des métastases en comparaison avec des souris sauvages (Cretney et al., 2002; Nagata, 1996). Ce phénotype associé à la perte de TRAIL et Fas implique que ces deux protéines participent à l'induction spécifique de l'apoptose des cellules tumorales *in vivo*. Une explication vient du fait que les cellules NK (*Natural Killer*), les lymphocytes B, les monocytes et les cellules dendritiques sous certaines stimulations (en particulier par les interférons de type I et II) expriment le ligand TRAIL à leur surface et pourraient donc induire spécifiquement l'apoptose des cellules anormales dont les cellules tumorales (Fanger et al., 1999; Griffith et al., 1999; Holoch and Griffith, 2009). Récemment, il a été montré que FasL avait également une efficacité pro-apoptotique accrue à l'état membranaire par rapport à un état sécrété (LA et al., 2009). En outre, les souris exprimant uniquement une forme membranaire de FasL présentent une réduction de la tumorigenèse hépatique par rapport aux souris exprimant la forme sécrétée de FasL suggérant que FasL et TRAIL ont des modes d'action similaires dans le contrôle de la tumorigenèse (LA et al., 2009).

3. Fonctions indépendantes du système immunitaire

Plus récemment, il a été montré que certains récepteurs de mort étaient exprimés dans des tissus indépendants du système immunitaire et qu'ils y jouaient des rôles essentiels. Ainsi, le récepteur TNF-R1 est exprimé dans les cellules du colon et favorise leur survie (Edelblum et al., 2008). D'autre part, le récepteur DR3 participerait à la différenciation des ostéoblastes et à la régulation de l'angiogenèse (Borysenko et al., 2006; Yang et al., 2004). Enfin, le récepteur $p75^{NTR}$ se distingue des autres récepteurs de mort de part son rôle majeur dans le système nerveux. Il est en effet impliqué dans le contrôle de la mort des neurones du système sympathique et des motoneurones (Brennan et al., 1999; Wiese et al., 1999).

III. La voie mitochondriale ou voie intrinsèque

A. Les stimuli induisant cette voie

Les stimuli capables d'induire la voie intrinsèque sont variés. En effet, cette voie peut être induite soit de manière directe suite à des dommages mitochondriaux induits par des UV, un choc thermique ou bien une privation en facteur de croissance qui vont entraîner le relargage du cytochrome C, la formation de l'apoptosome et l'apoptose ; soit de manière indirecte comme nous l'avons vu précédemment suite à un stress génotoxique ou bien à l'induction de la voie des récepteurs de mort (en particulier dans les cellules de type II). Dans ce deuxième cas, l'induction de la voie mitochondriale est liée à l'activité des procaspases 8/10.

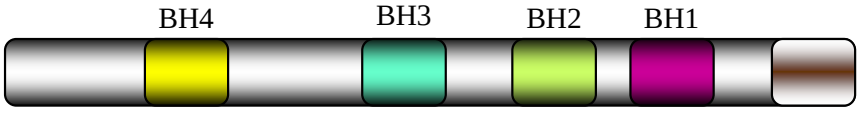
B. De la voie extrinsèque à la voie intrinsèque : rôle des protéines Bcl-2

La voie intrinsèque implique une famille de protéine particulière : les protéines de la famille Bcl-2 (*B-cell Lymphoma*) qui régulent la perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie. Cette famille comprend des protéines à fonction et structure variable (nombre de domaines BH pour *Bcl-2 Homology*) que l'on peut diviser en trois classes : les inducteurs de l'apoptose ou BH3-only protein (Bim, PUMA, Noxa, Bik, Bmf, Bad, Hrk et Bid), les effecteurs de l'apoptose (Bak, Bax, Bok), et les inhibiteurs de l'apoptose (Bcl-2, Bcl-$_{XL}$, Bcl-w, Mcl-1, A1) (Giam et al., 2008) **(figure 6A)**.

En absence de stimuli apoptotique, les protéines inductrices et effectrices seraient séquestrées par les protéines inhibitrices de la famille Bcl-2. En effet, le traitement de cellules en culture par un antagoniste de Bcl-2 (ABT-737) induit une mort cellulaire massive dépendante de Bak et de Bax. Des résultats similaires ont été obtenus grâce à la surexpression des protéines PUMA et Bik suggérant qu'elles sont capables de lever l'inhibition médiée par les protéines de type Bcl-2 (Chipuk et al., 2008; Shimazu et al., 2007) **(figure 6B)**. En

A. Structure des protéines membres de la famille Bcl-2

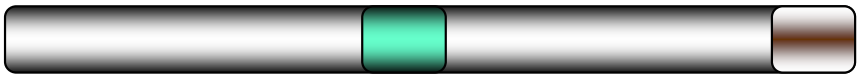
Membres anti-apoptotiques



Bcl-2, Bcl-$_{XL}$, Bcl-w, Mcl-1, A1

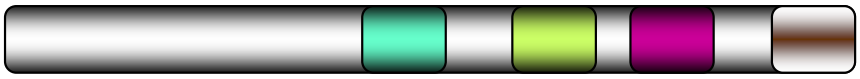
Membres pro-apoptotiques

Protéines inductrices



Bim, Puma, Noxa, Bik, Bmf, Bad, Hrk, Bid

Protéines effectrices



Bax, Bak, Bok

B. Activation de la voie intrinsèque

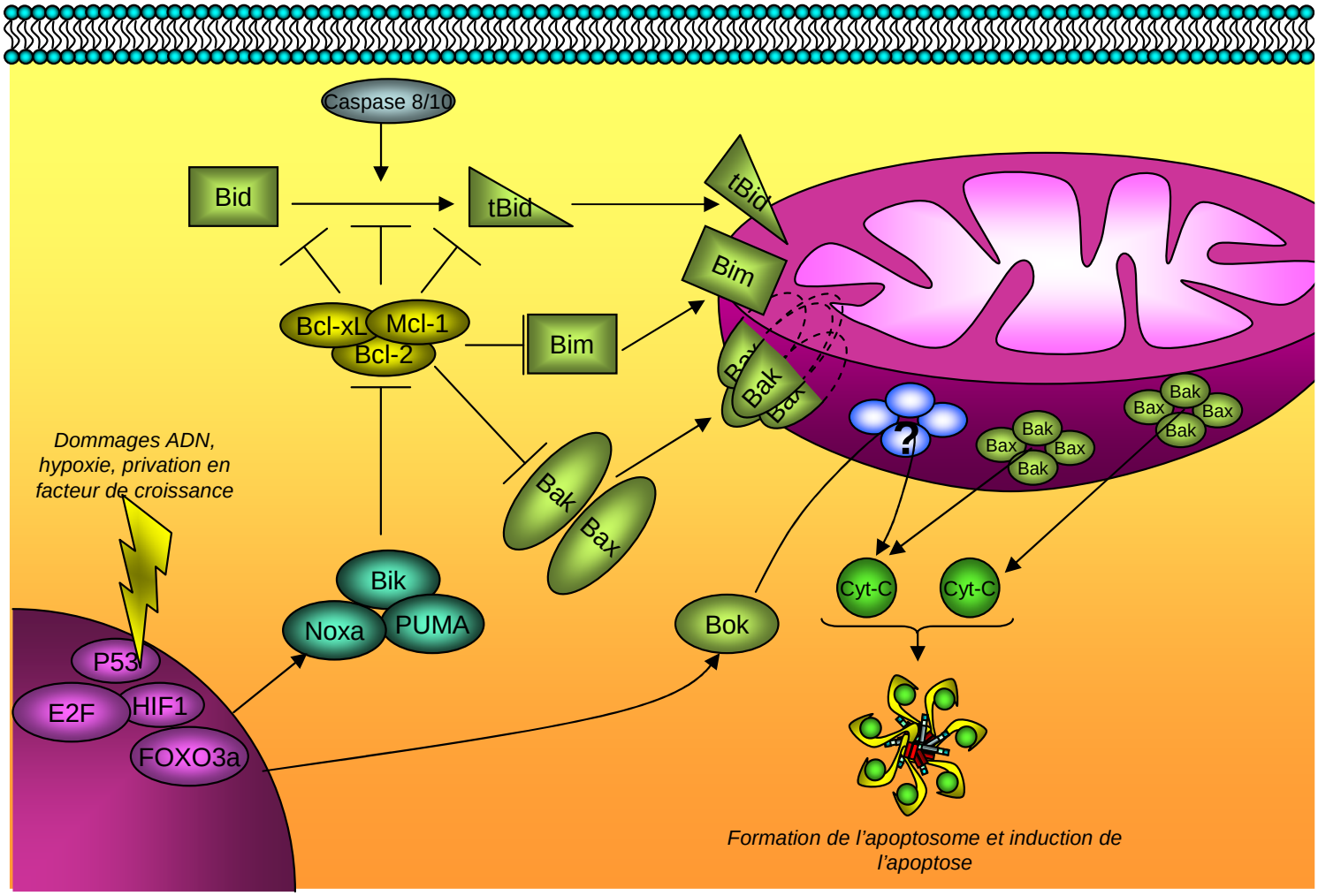


Figure 6 : Protéines de la famille Bcl-2

Cette famille se subdivise en 2 grandes catégories différentes d'un point de vue structural et fonctionnel : les protéines pro-apoptotiques qui contiennent entre 1 et 3 domaines BH et les protéines anti-apoptotiques contenant 4 domaines BH : BH1 (violet), BH2 (vert), BH3 (bleu) et BH4 (jaune).

réponse à un stimulus pro-apoptotique impliquant le DISC (fixation du ligand sur les récepteurs ou bien activation du DISC suite à des dommages ADN), la caspase 8/10 activée clive la protéine Bid, formant ainsi tBid (*truncated Bid*). Sous l'action de divers facteurs de transcription tels que p53 (en cas de dommages à l'ADN), HIF1 (en cas d'hypoxie), E2F, et FOXO3a (en cas de privation en facteur de croissance), les protéines PUMA, Bik, et Noxa sont également induites et lèvent la séquestration de tBid et Bim leur permettant de s'associer à la membrane externe de la mitochondrie (Hur et al., 2006; Shibue et al., 2006). Sous cette forme, tBid, et Bim recruteraient alors (avec la collaboration éventuelle de Bad) les protéines Bak et Bax puis induiraient un changement de leur conformation afin que le complexe Bak/Bax forme un pore dans la membrane mitochondriale et permette la libération de facteurs pro-apoptotiques tels que le cytochrome C (**figure 6B**) (Chipuk et al., 2008; Lovell et al., 2008). Le modèle d'activation du complexe Bak/Bax est toutefois controversé. En effet, les protéines Bak et Bax pourraient également être activées suite à la suppression de leur séquestration par les protéines inhibitrices de la famille Bcl-2 mais les données actuelles ne permettent pas de privilégier l'une ou l'autre de ces hypothèses (Lomonosova and Chinnadurai, 2008).

En cas de dommages à l'ADN, p53 induit la production de la protéine Bok qui est également capable d'entraîner le relargage cytosolique du cytochrome C par un mécanisme inconnu mais indépendant des protéines Bak/Bax **(figure 6B)** (Yakovlev et al., 2004).

C. Rôle de la voie intrinsèque

De manière générale, la voie intrinsèque permet l'élimination de toute cellule ayant subit des dommages importants au niveau mitochondrial ou encore au niveau ADN. Cette voie peut donc *a priori* être activée dans tous les types cellulaires. Toutefois, il est à noter que tous les types cellulaires ne réagissent pas de la même manière à un stimulus donné : par exemple alors que certaines cellules vont mourir suite à une privation en facteur de croissance, d'autres vont être capables de résister à cette privation et d'y survivre si elle est temporaire.

IV. Régulateurs généraux de l'apoptose

En fonction du type cellulaire l'activation de l'apoptose et plus particulièrement de la voie extrinsèque va conduire ou non à l'apoptose. Cette dualité s'explique par l'existence de nombreux régulateurs pro et anti-apoptotique de ces deux voies et par le fait que les cellules

sont en permanence soumises à de nombreux stimuli. Ainsi, la réponse à l'activation des voies pro-apoptotiques est complexe car elle intègre un ensemble de stimuli pro et anti-apoptotique (tels que la stimulation par des facteurs de croissance ou encore les interleukines). Au sein de la cellule, il existe en permanence un équilibre entre les voies pro et anti-apoptotique et c'est leur déséquilibre qui va conduire à l'apoptose ou au contraire à la survie cellulaire à l'origine de certains cancers.

A. Le cas particulier de l'apoptose caspase-indépendante

Les stimuli apoptotiques sont capables d'induire la mort cellulaire même dans un contexte où l'activation des caspases est bloquée. Morphologiquement, cette mort est similaire à l'apoptose caspase dépendante et elle a été observée dans plusieurs contexte *in vitro* et *in vivo* : (i) sur des cultures cellulaires traitées avec un inhibiteur général des caspases (z-VAD-fmk) ou surexprimant XIAP ; (ii) sur des cellules déficientes pour l'un des membres du complexe central de l'apoptose : l'apoptosome (apaf-1, caspase 9 ou cytochrome C) ; (iii) ou bien encore chez les souris mutantes (Knock Out) pour la protéine apaf-1 qui présentent un retard dans la formation des espaces interdigitaux mais en aucun cas une inhibition totale du processus (Denmeade et al., 1999; Hakem et al., 1998; Hirsch et al., 1997; Li et al., 2000; Yoshida et al., 1998). L'ensemble de ces éléments suggère qu'il existe un programme apoptotique caspase indépendant également appelé nécroptose capable de compenser une déficience des voies classiques d'activation des caspases.

La signalisation conduisant à la mort cellulaire par nécroptose est encore assez mal connue mais on distingue une étape d'initiation compensant une déficience d'activation des caspases initiatrices, et une étape de finalisation du processus capable de remplacer l'action des caspases effectrices. Dans un contexte où les caspases sont bloquées, il a été montré que la fixation du ligand TNF (Tumor Necrosis Factor) sur les récepteurs de mort TNF-R1 entraîne l'activation de la phospholipase A_2 (PLA_2) qui permet la formation de ROS (*Reactive Oxygen Species*) dans le cytosol. Un autre mécanisme d'initiation de la nécroptose par les récepteurs de mort implique le récepteur Fas et la protéine adaptatrice FADD. Après oligomérisation de Fas en présence de son ligand FasL, la protéine FADD est recrutée et permet l'activation de la protéine kinase RIP1. Cette dernière est à l'origine de la destruction du complexe mitochondrial composé de l'adenine nucléotide translocase/Cyclophiline D conduisant à un dysfonctionnement mitochondrial (Holler et al., 2000; Temkin et al., 2006).

Ce dysfonctionnement ainsi que les ROS portent atteinte à l'intégrité de la membrane mitochondriale et seraient à l'origine de la perméabilisation de sa membrane externe (Tait and

Green, 2008). La seconde étape de la nécroptose est liée à la libération de protéines de l'espace intermembranaire mitochondrial dans le cytosol : cytochrome C, smac/DIABLO, HtrA2/Omi, Endonucléase G (Endo G), et le facteur d'induction de l'apoptose (AIF) (Du et al., 2000; Li et al., 2001; Susin et al., 1999; Suzuki et al., 2001; Verhagen et al., 2000). Alors que smac/DIABLO et le cytochrome C vont induire l'activation des caspases et l'induction d'une apoptose caspase dépendante par les mécanismes décrits précedemment ; AIF, l'endoG et HtrA2/Omi vont mimer les actions normalement remplies par les caspases et conduire à une apoptose caspase-indépendante. Ainsi, les protéines AIF et l'Endo G sont transloquées dans le noyau et induisent la condensation de la chromatine et la fragmentation de l'ADN (Li et al., 2001; Lorenzo et al., 1999). En parallèle, la sérine protéase HtrA2/Omi va dégrader des substrats cytosquelettiques tels que l'actine et les tubulines α et ß (Vande Walle et al., 2007), l'ensemble conduisant à la formation des corps apoptotiques (**figure 7**).

B. Protéines régulatrices de la voie extrinsèque

1. Le rôle des Decoy Receptor

Les Decoy Receptor (DcR) ou récepteurs leurres – TRAIL-R3, TRAIL-R4, DcR3 et l'OPG - ont une structure identique aux récepteurs de mort à ceci près qu'ils n'ont pas de domaine intracellulaire et sont donc incapables de transduire un signal pro-apoptotique (Emery et al., 1998; Lavrik et al., 2005; Merino et al., 2006). Ils modulent donc l'effet des récepteurs de mort et entrant en compétition avec leurs ligands (**figure 7**)(Merino et al., 2006). Ainsi, TRAIL-R3 et l'OPG diminuent la sensibilité des lymphocytes périphériques à l'apoptose médiée par TRAIL (Emery et al., 1998; Sheridan et al., 1997). Par ailleurs, DcR3 bloque l'apoptose des cellules endothéliales médiées par le ligand TL1A ce qui entraîne une stimulation de l'angiogénèse. En effet, il a été montré que DcR3 induit *in vitro* et *in vivo* l'apparition de nouveaux vaisseaux sanguins (Yang et al., 2004). Enfin, TRAIL-R4 est exprimé de manière ubiquitaire et permettrait de protéger les cellules saines de l'apoptose médiée par TRAIL. De plus, TRAIL-R4 est capable de bloquer l'apoptose via deux mécanismes : d'une part en fixant TRAIL et en l'empêchant de fixer TRAIL-R2 mais aussi d'autre part en liant TRAIL-R2 via son domaine PLAD masquant alors le site de fixation de TRAIL sur TRAIL-R2 (Clancy et al., 2005). Cette deuxième hypothèse a été émise suite à l'observation que des cellules surexprimant TRAIL-R2 et un mutant de TRAIL-R4 incapable de fixer TRAIL sont résistantes à la mort médiée par TRAIL (Clancy et al., 2005).

Certaines tumeurs expriment fortement les récepteurs leurres. Elles deviennent alors insensibles à la mort médiée par TRAIL, ce qui favorise la progression tumorale. En ce sens,

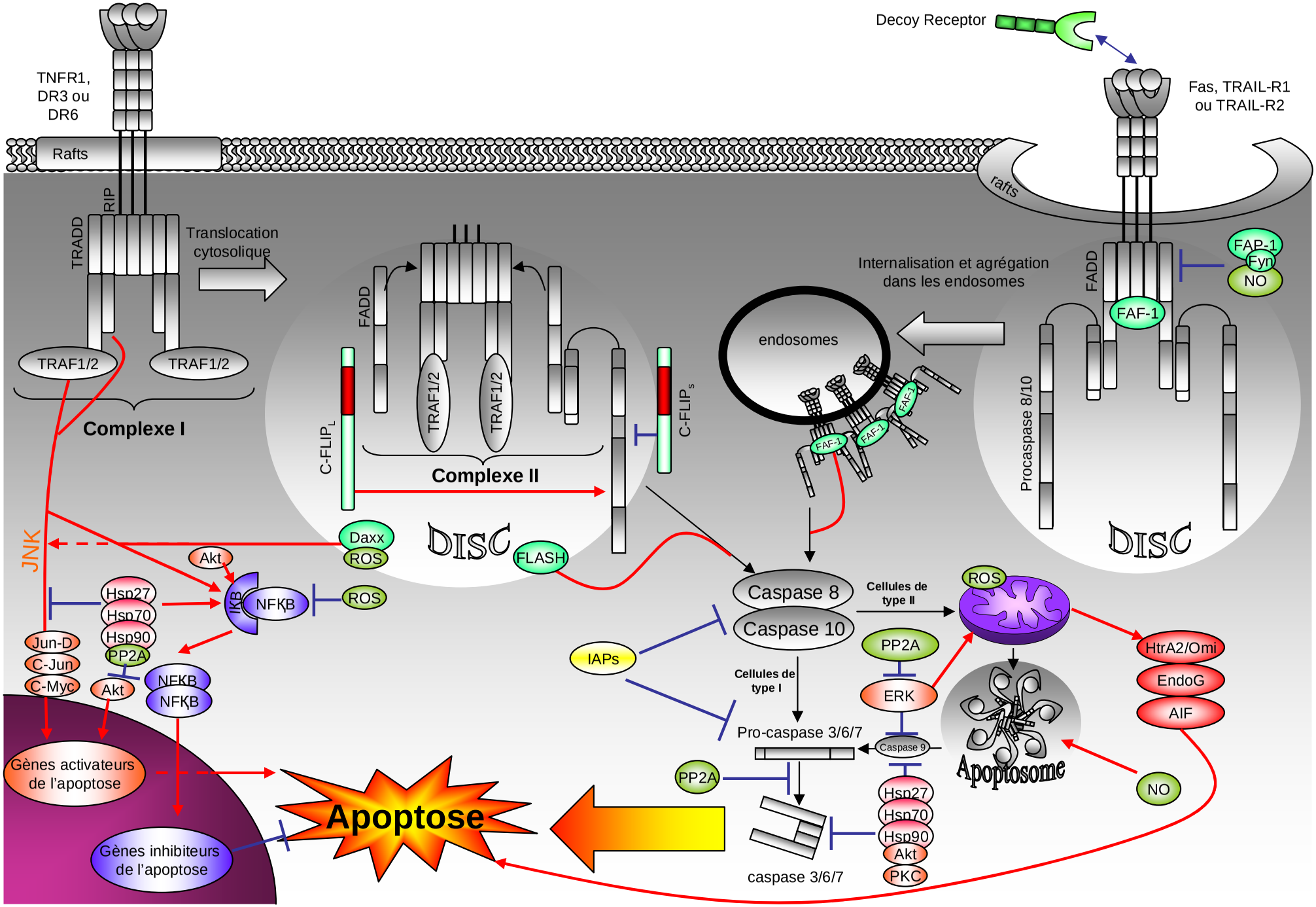


Figure 7 : Régulation des voies de signalisation apoptotique extrinsèque et intrinsèque.

Les stimuli reçus par la cellule modulent l'apoptose en induisant différentes protéines accessoires qui vont activer (flèches rouges) ou inhiber (flèches bleues) différentes étapes clés du processus apoptotique. Parmi ces régulateurs, on distingue des protéines accessoires du DISC (en vert-bleu), les IAPs (en jaune), les Hsp (en rose) ou encore les MAPK, Akt et différents facteurs de transcriptions (en orange et bleu). les oxydes nitriques (NO) et les espèces réactives de l'oxygène (ROS) –ici représentés en vert- sont des régulateurs plus généraux affectant différents modulateurs.

l'expression des DcR a récemment été caractérisée comme un facteur pronostic dans les tumeurs mammaires et colorectales (Ganten et al., 2009; Granci et al., 2008).

2. Protéines régulatrices à domaine DED

Par interaction homotypique impliquant leur domaine DED, les protéines c-FLIP, TRAF1, TRAF2 et RIP sont capables de s'associer à FADD et de moduler l'activité du DISC (**figure 7**).

C-FLIP (*Cellular FLICE/Caspase 8 Inhibitory Protein*) est un homologue de la caspase 8 comportant un domaine DED et un site catalytique inactif. C-FLIP est exprimé sous 3 formes : une forme longue (c-FLIP$_L$), et deux formes courtes (c-FLIP$_S$ et c-FLIP$_R$). Alors que les formes courtes sont décrites pour interagir avec FADD et la pro-caspase 8, inhiber l'interaction FADD/Caspase 8, et donc avoir un rôle anti-apoptotique (Krueger et al., 2001), le rôle de la protéine c-FLIP$_L$ est controversé. En effet, certaines études décrivent c-FLIP$_L$ comme un facteur pro-apoptotique (Micheau et al., 2002; Shu et al., 1997) et d'autres au contraire comme un facteur anti-apoptotique (Irmler et al., 1997) – pour revue voir (Yu and Shi, 2008). Ces deux fonctions antagonistes de c-FLIP$_L$ peuvent s'expliquer par son taux d'expression. Lorsqu'elle est fortement exprimée, c-FLIP$_L$ entrerait en compétition avec la caspase 8, empêcherait sa fixation sur FADD, et donc l'induction de l'apoptose ; au contraire, à un taux plus faible, c-FLIP$_L$ serait toujours adressé au DISC et interagirait avec la caspase 8. C-FLIP$_L$ modifierait la conformation du domaine catalytique de la procaspase 8 lui permettant d'acquérir une activité caspase suffisante pour cliver des substrats synthétiques *in vitro* et pour son auto-activation par protéolyse (Micheau et al., 2002; Yu et al., 2009) **(figure 7)**.

Par ailleurs, c-FLIP participe au recrutement des protéines RIP et TRAF1/2 au sein du DISC (Yu and Shi, 2008). L'activité kinase des protéines RIP et TRAF1/2 est à l'origine de l'activation de la voie JNK (*c-Jun N-Terminal protein Kinase*) qui aboutit à l'activation de nombreux facteurs de transcription tels que c-Jun, JunD et c-Myc (Dhanasekaran and Reddy, 2008; Wilson et al., 1996). Ces derniers activent la transcription de gènes pro-apoptotiques tels que TNFα, FasL ou encore PUMA aboutissant à une boucle d'amplification positive du signal pro-apoptotique (Cazanave et al., 2009; Dhanasekaran and Reddy, 2008).

RIP et TRAF1/2 peuvent aussi conduire à la phosphorylation de la protéine IκB qui séquestre sous forme non-phosphorylée, le facteur de transcription NFκB dans le cytoplasme. Ainsi, la phosphorylation d'IκB permet la libération de NFκB qui, sous forme dimérique, est transloqué dans le noyau et active la transcription de multiples gènes tels que les IAPs, des

protéines inhibitrices de la voie mitochondriale et les gènes TRAF1/2 conduisant à une boucle d'amplification d'un signal anti-apoptotique (Bharti and Aggarwal, 2002; Micheau and Tschopp, 2003).

3. Les protéines accessoires régulatrices du DISC

D'autres protéines sont capables d'interagir avec le DISC : Daxx, FLASH et FAF-1 (**figure 7**). Daxx et FLASH stimulent respectivement l'activation de la voie JNK et de la caspase 8 (Peter and Krammer, 2003). FAF-1 (Fas Associated Factor 1) interagit avec Fas, stimule l'activation de la caspase 8 et au contraire, bloque l'activation de la voie NFκB (Park et al., 2004b; Ryu et al., 2003).

Il est également à noter que le processus d'oligomérisation des récepteurs de mort est dépendant de leur phosphorylation contrôlée notamment par la protéine phosphatase FAP-1 (Fas Associated Phosphatase 1) et de la protéine kinase Fyn (Gloire et al., 2008).

C. Régulation de la voie intrinsèque et de l'activité des caspases

1. Protéines régulatrices des caspases : les IAPs

Cette classe de protéine exprimée en absence de stimulus apoptotique a pour fonction principale la protection cellulaire contre une induction aspécifique de l'apoptose. Toutefois, certaines IAPs telles que XIAP ont également d'autres rôles. Ainsi XIAP permettrait de distinguer les cellules de type I et de type II lors de l'activation de la voie extrinsèque ou encore de réguler l'activité des caspases au cours de l'apoptose (voir paragraphe I.C p9) (**figure 7**).

2. Protéines kinases régulatrices des caspases :

Outre les IAPs, l'activité mais aussi la fonction des caspases peuvent être modulées par phosphorylation. En effet, en cas de stimulation des cellules par des facteurs de croissance ou bien au cours de la mitose, la caspase 9 est phosphorylée et inhibée par les protéines kinases Akt et ERK (*Extracellular Regulated Kinase*), ou par la Protéine Kinase C ζ (Allan et al., 2003; Brady et al., 2005; Cardone et al., 1998). Suite à des stimuli similaires, les caspases 2, 3 et 8 peuvent également être inhibées par phosphorylation suite à l'action des protéines kinases : CaMKII, CK2, p38 MAPK, Src, Fyn, Lyn et SHP1. Certaines phosphorylations vont au contraire stimuler l'activité des caspases en condition apoptotique : c'est le cas de la protéine kinase c-Abl et de la protéine kinase PKCδ qui ont pour cible les caspases 9 et 3 (Kurokawa and Kornbluth, 2009).

De manière intéressante, la phoshophorylation des caspases peut également conduire à un changement de fonction. En effet, il a été montré que la caspase 2 pouvait également être associée à un phénomène de réparation de l'ADN (Shi et al., 2009). Un modèle émergent implique la protéine kinase ATM (*Ataxia Telangectasia Mutated*) activée en cas de stress génotoxique, comme régulateur central de la balance apoptose/réparation de l'ADN. En cas de stress important, ATM induirait p53, la formation du PIDDosme dans le cytosol et l'induction d'une apoptose caspase 2 dépendante. Au contraire, en cas de dommages ADN mineurs, ATM permettrait l'activation de sérine/thréonine kinase nucléaires : les DNA-PKcs ayant pour cible la caspase 2. Cette dernière serait alors recrutée par un PIDDosome nucléaire (composé de PIDD et des DNA-PKCs) qui participerait à la réparation de l'ADN et à la survie cellulaire. Dans ce cas, la caspase 2 est également activée sans pour autant conduire à l'apoptose (Shi et al., 2009). Il est possible que ce phénomène non-apoptotique soit lié à la séquestration nucléaire de la phospho-caspase 2 qui l'empêcherait d'agir sur ses substrats cytosoliques (Krumschnabel et al., 2009). L'activation des caspases 2, 3 et 9 a également été associée à un phénomène non-apoptotique : la différenciation érythrocytaire. Dans les dernières phases de différenciation des érythroblastes en érythrocytes sous l'action de l'érythropoïétine, les caspases 2, 3 et 9 sont activées et clivent certains de leurs substrats pro-apoptotiques nucléaires tels que la Lamine B. Ce clivage est important pour permettre l'énucléation des érythrocytes mais insuffisant pour induire l'apoptose (Zermati et al., 2001). Dans ce cas, la protection contre l'apoptose n'est pas liée à une phosphorylation des caspases mais à l'intervention de protéines chaperones : les protéines de choc thermiques (Hsp) (Ribeil et al., 2007).

3. Les protéines chaperones

Parmis les protéines de choc thermique, les protéines Hsp27, Hsp90 et Hsp70 ont un rôle anti-apoptotique via la protection de certaines protéines. Ainsi, elles sont capables de bloquer l'activation de la caspase 9 : soit en inhibant la formation de l'apoptosome par interaction avec Apaf-1, soit plus indirectement en stabilisant les sérine/thréonine kinases responsables de la phosphorylation inhibitrice de la caspase 9 : Akt et PKC. Hsp27, Hsp90 et Hsp70 peuvent également inhiber la voie pro-apoptotique JNK et au contraire favoriser l'activation de la voie anti-apoptotique NFκB (Lanneau et al., 2007) (**figure 7**).

La fonction anti-apoptotique des protéines chaperones est souvent associée à un rôle dans la différenciation cellulaire (Lanneau et al., 2007). Ainsi la protéine Hsp70 intervient dans la différenciation érythrocytaire en protégeant un substrat de la caspase 3 : GATA1.

GATA1 est un facteur de transcription capable d'induire la production de facteurs anti-apoptotiques et impliqué dans la différenciation des érythrocytes sous l'action de l'érythropoïetine (EPO). Il a été montré qu'en cas de privation en facteur de croissance, ou d'induction de la voie des récepteurs de mort Fas, GATA-1 est clivé et inactivé par la caspase 3. Au contraire, malgré l'activation de la caspase 3, GATA-1 n'est pas clivé dans les dernières étapes de la différenciation érythrocytaire (Zermati et al., 2001). Ce phénomène s'explique par l'interaction de GATA-1 avec la protéine Hsp70. Cette dernière est capable de fixer GATA-1 au niveau nucléaire après stimulation à l'EPO et d'empêcher son clivage par la caspase 3. Au contraire, en absence de stimulation par l'EPO, Hsp70 est transloquée dans le cytosol et permet le clivage de GATA1, l'arrêt de la différenciation et l'induction de la mort cellulaire (Ribeil et al., 2007). De manière similaire, les protéine Hsp27 et Hsp90 serait impliquée dans la différenciation des cellules de la lignée rouge, des cellules musculaires et des kératinocytes (Lanneau et al., 2007).

D. Régulateurs généraux de l'apoptose

1. Rôle des ROS et du NO

Les oxydes nitriques (NO) et les formes réactives de l'oxygène (ROS) sont produites en réponse à l'induction de la voie des récepteurs de mort via l'activation respective des NOS (*Nitric Oxide Synthase*) et d'enzymes telles que la phospholipase A_2. En fonction du type cellulaire, les NO ont un rôle pro ou anti-apoptotique : d'une part ils peuvent inhiber les protéines inhibitrices de la famille Bcl-2 favorisant la formation de l'apoptosome et d'autres part, ils sont capables de bloquer la production d'une classe particulière de sphingolipides nécessaires à la trimérisation des récepteurs de mort (Dash et al., 2007; Perrotta et al., 2005; Snyder et al., 2009) (**figure 7**).

Les ROS quant à eux ont un rôle plutôt pro-apoptotique. Ils sont en effet capables d'induire des modifications d'acides aminés tels que le changement de cystéine en sérine ce qui conduit à des inactivations protéiques. Ainsi, les ROS sont capables de bloquer le fonctionnement du facteur de transcription NFκB et au contraire d'activer la voie JNK (Kamata et al., 2005). L'action large des ROS sur l'ensemble des protéines a également pour conséquence une déstabilisation de la membrane mitochondriale et la libération du cytochrome C (cf. § V. A) (**figure 7**).

2. Rôle des protéines kinases Akt et MAPK

La protéine kinase Akt exerce une action anti-apoptotique via la phosphorylation de plusieurs substrats. Ainsi, Akt inhibe la caspase 9, la protéine pro-apoptotique Bad (appartenant à la famille Bcl-2 – non-représenté sur la figure 7), et les facteurs de transcription FOXO (activant notamment l'expression de FasL) et au contraire stimule la libération et ainsi l'activation du facteur de transcription NFκB (Franke, 2008) (**figure 7**).

Les protéines kinases ERK, JNK et p38 MAPK appartiennent toutes les trois à la famille des MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase), toutefois leur activation dépend des stimuli auxquelles les cellules sont exposées. En effet, alors que la p38MAPK et la voie JNK sont activées en réponse à un stimulus apoptotique ou un stress cellulaire (notamment via l'intervention de RIP et TRAF1/2), la voie anti-apoptotique ERK est activée en réponse à des mitogènes ou des facteurs de croissance (Junttila et al., 2008).

De manière générale, les MAPK s'organisent en cascade de protéines kinases –on parle de MAPKKK (*Mitogen Activated Protein Kinase Kinase Kinase*), MAPKK (*Mitogen Activated Protein Kinase Kinase*), et MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinase*) en fonction du niveau de signalisation où se situent les protéines kinases. Ainsi, la voie ERK est caractérisée par l'activation de la petite protéine G Ras (suite à la fixation de facteurs de croissance sur des récepteurs transmembranaires spécifiques) qui elle-même recrute et active la sérine-thréonine kinase Ras (MAPKKK). Ras active à son tour par phosphorylation la protéine kinase MEK1,2 (MAPKK) qui active ERK (MAPK). ERK exerce alors son action anti-apoptotique en inactivant par phosphorylation la caspase 9 et Bad, et en activant le facteur de transcription CREB contrôlant l'expression des gènes anti-apoptotiques *bcl-2*, *bcl-1* et *bcl-xl* (Holmstrom et al., 2000; Junttila et al., 2008). Il est à noter que ERK et Akt sont capables d'inhiber conjointement l'apoptose en stabilisant XIAP et la Survivine. En effet, leur phosphorylation bloque leur ubiquitinylation et leur dégradation par le protéasome (Dan et al., 2004; Jeong et al., 2009; Jia et al., 2003).

La voie JNK suit un schéma similaire : les MAPKKK (ASK1, HPK1, MLK-3, MKKK1–4, TAK-1, et TPL-2) activées en réponse aux stimuli apoptotiques activent les MAPKK (MKK4 et MKK7) aboutissant à l'activation finale des JNK dont les substrats pro-apoptotiques ont été évoqués précedemment (cf. paragraphe IV C.2 p18). Enfin, la p38 MAPK est activée suite à de nombreux types de stress cellulaire (hypoxie, choc thermique, infection par un pathogène, inflammation, etc) par autant de MAPKK (MKK3, 4, 6, 7) et MAPKKK (telles que ASK-1, MTK, TAK-1, MLK3, MEKK1-4, etc) (Junttila et al., 2008). Au final, la p38 MAPK est capable d'inhiber certaines caspases par phosphorylation et d'activer un ensemble de facteurs de transcription : p53, Elk-1, MEF-2, ATF-2 et CHOP-1

modulant ainsi l'expression d'une batterie de gène impliqué dans l'apoptose ou dans la régulation du cycle cellulaire. A l'heure actuelle, le rôle pro ou anti-apoptotique de la p38 MAPK est le sujet de controverses. En effet, alors qu'il a été montré que l'activation de la p38 MAPK via la phosphorylation de p53 conduit à un arrêt du cycle cellulaire (Bulavin and Fornace, 2004; Bulavin et al., 2001) d'autres études montrent que l'activité de la p38 MAPK est corrélée à la survie cellulaire, à la croissance et au pouvoir invasif tumoral (Johansson et al., 2000; Junttila et al., 2007a).

3. Rôle central des complexes PP2A

Comme nous venons de l'évoquer, kinases et phosphatases ont un rôle essentiel dans la régulation de l'oligomérisation des récepteurs de mort, de l'activité des caspases et de l'activité des facteurs de transcription, impliquant que les mécanismes de phosphorylation/déphosphorylation ont un rôle clé dans la régulation de l'apoptose.

Le complexe PP2A exerce un contrôle sur de nombreux régulateurs de l'apoptose via son activité phosphatase. Ce complexe est composé d'une sous-unité catalytique (C) conservée et de deux autres sous-unités ayant de nombreuses isoformes : une sous-unité structurale (A) et une sous-unité régulatrice (B). Il existe 2 types de sous-unités A (ou PR65) : α et ß, et de nombreuses sous-unités de type B comprenant les protéines de groupe B, B', B'' et B'''. Alors que la sous-unité B est à l'origine de la spécificité de substrat du complexe PP2A, la nature de la sous-unité PR65 (α ou β) semble à l'origine d'une fonction pro- ou au contraire pro-apoptotique du complexe PP2A (Eichhorn et al., 2009; Mumby, 2007).

En effet, alors que la suppression de PR65α par siRNA entraîne la mort cellulaire, à l'inverse, la suppression de PR65β induit une transformation tumorale des cellules en culture (Sablina et al., 2007). De manière générale, rares sont les études où les sous-unités PR65β ou PR65α ont été clairement impliqués, la plupart des études sur PP2A utilisant soit l'acide okadaïque (un inhibiteur ciblant d'autres phosphatases telles que PP1), soit un siRNA dirigé contre la sous-unité catalytique de PP2A. Plus spécifiquement, seules deux études montrent que PR65α est une protéines anti-apoptotique capable d'activer Ras et de stimuler la transformation tumorale (Ory et al., 2003; Sablina et al., 2007), et une dizaine d'études caractérisent la fonction pro-apoptotique de PR65β ainsi que son rôle de suppresseur de tumeur. Actuellement trois voies majeures peuvent être distinguées comme pouvant expliquer la fonction de PR65β/PP2A dans la signalisation apoptotique : (i) l'inhibition du facteur de transcription NFκB, (ii) l'inhibition de la rhoGTPase RalA et enfin (iii) l'inhibition de la protéine kinase Akt. Il a été montré que le facteur de transcription NFκB pouvait être inhibé

par déphosphorylation (ser 536) via le complexe PR65β-PP2ACα (Li et al., 2006a; Yang et al., 2001). Ainsi, cela pourrait conduire à l'inhibition indirecte de gènes anti-apoptotiques comme bcl-2, bcl-XL ou les gènes codant pour les IAPs favorisant ainsi l'apoptose (Bharti and Aggarwal, 2002; Micheau and Tschopp, 2003). Ce complexe est également capable d'inhiber la protéine kinase anti-apoptotique Akt par déphosphorylation et donc contribuer à l'activation des caspases (Mumby, 2007). Enfin, il a été montré que le complexe PR65β/PP2A était capable d'inhiber RalA par déphosphorylation (ser 183 et ser 194), une rhoGTPase capable (à l'état phosphorylé) de stimuler la survie et la transformation cellulaire par un mécanisme mal connu (Sablina et al., 2007).

Par ailleurs, de part sa fonction pro-apoptotique, il a été suggéré que PR65β jouerait le rôle de suppresseur de tumeur. Dans ce sens, de nombreuses mutations de type perte de fonction ont été identifiées dans les cancers du poumon, du colon, de l'ovaire, de la thyroïde et du sein (L101P, V448A, V545A, G8R, K943E et P65S)(Wang et al., 1998). De manière intéressante, il a été montré récemment que dans les cancers gastriques et mammaires ainsi que dans de nombreuses lignées tumorales, un inhibiteur de PP2A : CIP2A (*Cancerous Inhibitor of PP2A*) était surexprimé et favorisait la transformation tumorale en stabilisant c-myc. En effet, CIP2A est capable d'interagir avec la sous-unité PR65 et ainsi d'induire une inhibition de la phosphorylation de c-Myc (ser 62) par PP2A, phénomène conduisant normalement à la dégradation de c-Myc (Junttila et al., 2007b; Junttila and Westermarck, 2008; Khanna et al., 2009).

En résumé, PP2A via son activité phosphatase participe à l'apoptose en activant p53 Bad et Bax, et en inhibant Bcl-2, c-myc, Akt, ERK et NFκB (**figure 8**). A l'inverse PP2A exerce également un rôle anti-apoptotique en inhibant principalement les calpaïnes, la caspase 3, TRAF-2, la voie JNK et en activant la voie NFκB (Eichhorn et al., 2009).

V. Déséquilibre des voies intrinsèques et extrinsèques et thérapies antitumorales ciblées

A. Dérégulations principales observées dans les cancers

Les régulations des voies intrinsèques et extrinsèques étant nombreuses, la perte d'expression des protéines activatrices, leur perte de fonction ou à l'inverse la surexpression ou le gain de fonction des protéines inhibitrices des voies d'apoptose peut conduire à la perte de sensibilité des cellules à l'apoptose et donc à l'apparition des cancers.

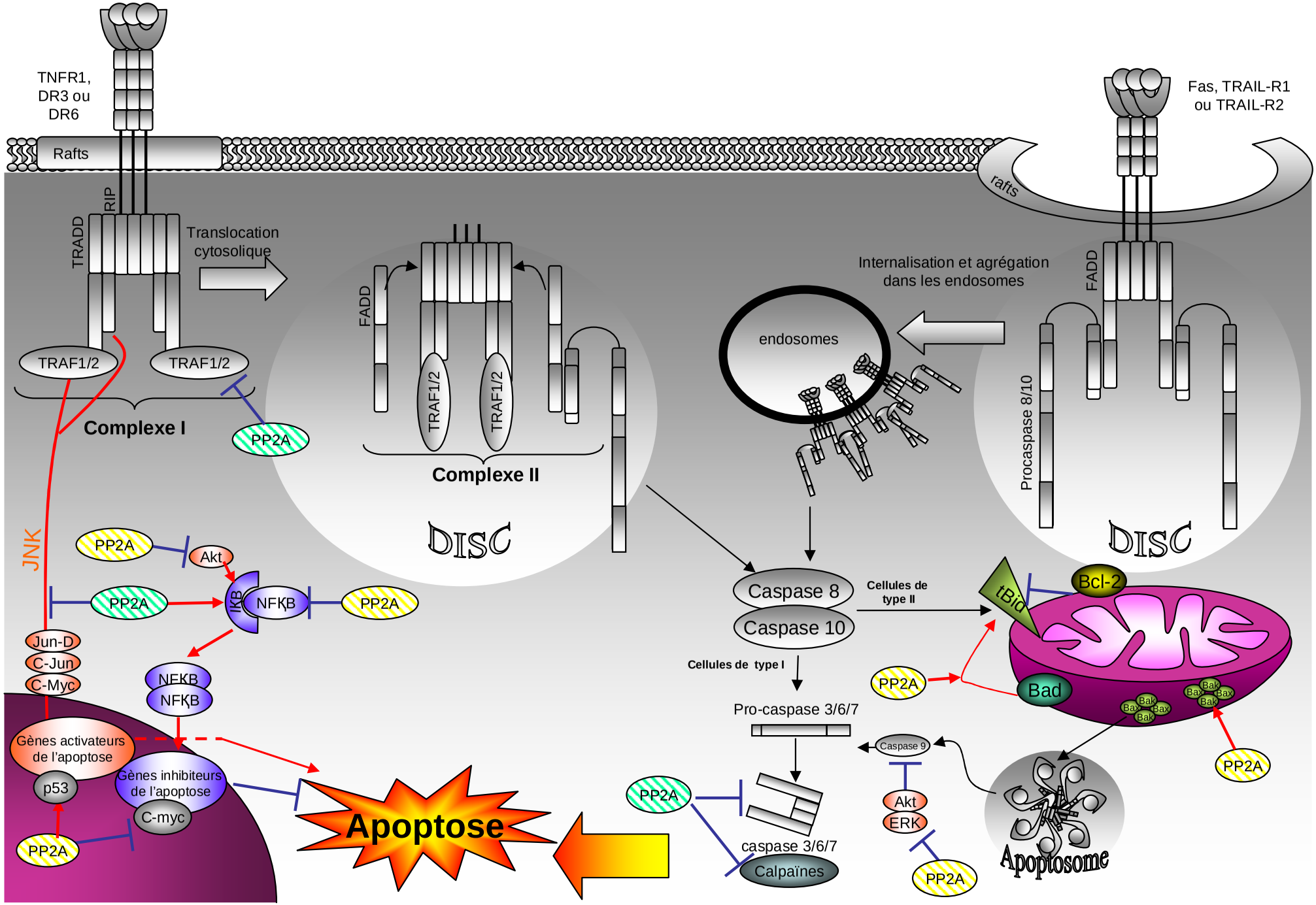


Figure 8 : Rôle central de PP2A dans la régulation de l'apoptose

Deux types de complexes PP2A peuvent être distingués : les complexes pro-apoptotiques (rayés jaune) et les complexes anti-apoptotiques (rayés vert). En activant (flèches rouges) ou en inhibant (traits bleus) différents partenaires ou régulateurs des voies de signalisation pro-apoptotique médiées par les récepteurs de mort, ces complexes modulent l'apoptose.

Ainsi, la perte d'expression de fonction des protéines pro-apoptotique peut être liée à des mutations inactivatrices ou bien à des mécanismes plus spécifiques. En effet, il a été montré que les récepteurs de mort TRAIL-R1 et TRAIL-R2 pouvaient être inactivés par un phénomène d'endocytose constitutive observée dans le cancer du sein et conduisant à une perte de sensibilité des cellules cancéreuses à l'apoptosée induite par TRAIL. Les dérégulations observées pour les principaux acteurs et leurs cancers associés sont représentés **figure 9** (Krepela et al., 2009; Leone et al., 2000; Teitz et al., 2000; Vogler et al., 2008; Wolf et al., 2001; Zhang and Fang, 2005; Zhang and Zhang, 2008).

B. Thérapies anti-cancéreuses : généralités

1. Classification

Deux types de traitements contre les cancers peuvent être distingués : les traitements dits classiques tels que la chimiothérapie et la radiothérapie applicables à tous les types de tumeurs et les traitements ciblés plus spécifiques.

La chimiothérapie et la radiothérapie sont des bloquants du cycle cellulaire. En effet, ces traitements sont capables de bloquer la formation du fuseau mitotique ou bien de bloquer la réplication de l'ADN aboutissant dans les deux cas à une inhibition de la division cellulaire. L'inconvénient majeur de ces traitements est leur absence de spécificité vis-à-vis de la tumeur. Ils vont en effet toucher les tissus sains tels que les cellules souches hématopoïétiques provoquant une anémie. D'autres effets secondaires liés à cette aspécificité rendent ces traitements difficiles à supporter pour les patients : nausées, asthénie, céphalées, alopécie, etc. De plus, ces effets aspécifiques sont à l'origine d'une limitation du traitement : la dose efficace de tels traitements pour un patient donné peut être intolérable pour ce dernier. Il a donc été nécessaire de développer d'autres traitements dits ciblés, attaquant préférentiellement le tissu tumoral et ayant des effets secondaires limités à nuls. En effet, depuis une quinzaine d'années, une nouvelle classe d'agents thérapeutiques ciblés, agissant plus spécifiquement sur des cibles impliquées dans la dérégulation de la division cellulaire est apparue.

Plusieurs types de traitements ciblés peuvent être distingués : les inhibiteurs du cycle cellulaire, les inhibiteurs de la transduction de signal ciblant des récepteurs aux facteurs de croissance ou des tyrosines kinases, les hormonothérapies et les anti-angiogéniques qui n'ont pas une action directe sur la tumeur mais sur sa néovascularisation.

2. Les différents types de thérapies ciblées

Classe de protéine	Protéine dérégulée	Mutation, perte de fonction	Surexpression, gain de fonction	Référence
Récepteurs pro-apoptotiques	TNF-R1	pas de rôle direct établit dans l'induction des cancers		
	TNF-R2	pas de rôle direct établit dans l'induction des cancers		
	Fas	Nombreux cancers solides (peau, poumon, estomac, vessie, prostate, etc.) et lymphomes.		De thonel *et al* 2005
	TRAIL R1	Cancer du colon et du poumon		De thonel *et al* 2005
	TRAIL R2	Cancer du colon et du poumon		De thonel *et al* 2005
Récepteurs leurres	TRAIL R3		Cancer du colon et de l'estomac	De thonel *et al* 2005
	TRAIL R4		Cancer du colon	De thonel *et al* 2005
	DcR3		Glioblastome, cancer du poumon, de la rate et du colon.	Pitti *et al* 1998
	OPG		cancer du sein	Reid *et al* 2009
Ligands	TRAIL		Nombreux cancers	Zhang & Zhang, 2008
	FasL		Nombreux cancers	Zhan & Zhang, 2008
Régulateurs pro-apoptotiques	TRADD	Leucémies		Dechant MJ. et al 2008
	IKB	Lymphomes de Hodgkin		Mayo *et al* 1999
	Caspase 8	Cancer du colon, neuroblastome, cancer du poumon et médulloblastome		De thonel *et al* 2005
	Bak/Bax	Lymphomes, cancer du colon, du poumon, du pancréas		Zhang & Zhang 2008
	Apaf-1	Cancer de l'ovaire		Wolf et al, 2001
	Smac/DIA BLO	Nombreux cancers		Zhang & Zhang 2010
	PR65β	Cancer utérin, mammaire, hépatique, colorectal, thyroïdien, ovarien, etc.		Mumby *et al*, 2008
Régulateurs anti-apoptotiques	MAPK (ERK)		Nombreux cancers	Zhang & Zhang, 2008
	c-FLIP		Cancer du colon, du pancréas, lymphomes de Burkitt	De thonel *et al* 2005
	IAPs (XIAP, Survivine)		Nombreux cancers	Zhang & Zhang, 2008
	Akt		Leucémies, mélanomes	Chapuis *et al* 2009
	NFKB		Leucémies lymphoïdes chroniques, lymphomes non- Hodgkiniens	De thonel *et al* 2005
	Bcl-2/Bcl-XL		Lymphomes, cancer du colon, du poumon, du pancréas	Zhang & Zhang 2008

Figure 9 : Tableau résumant les principales dérégulations affectant les principaux récepteurs, ligands et régulateurs impliqués dans les voies de signalisation apoptotiques intrinsèque et extrinsèque.

Contrairement aux traitements classiques, ces traitements s'appliquent spécifiquement à certains types de tumeurs en fonction des dérégulations qu'elles présentent. Ainsi, **les agents inhibiteurs du cycle** s'adressent aux cellules tumorales dont les régulateurs principaux du cycle cellulaire : les cdks (*Cyclin Dependent Kinase*), sont constitutivement activés conduisant à une stimulation permanente du cycle cellulaire. Ces inhibiteurs du cycle cellulaire sont capables d'induire le blocage des cdks mais sont également capables d'induire l'apoptose par induction de la voie intrinsèque. Par exemple, il a été montré *in vitro* sur plusieurs types cellulaires (lignées tumorales pulmonaires, lignées de neuroblastome ou de leucémie) que la drogue RKS262 était capable d'inhiber cdk6 mais aussi d'activer par un mécanisme peu connu l'expression des protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 : Bid, Bak et Bok ; et au contraire d'inhiber Bcl-$_{XL}$ et Mcl-1 conduisant à l'apoptose des cellules tumorales (Singh et al., 2009). Des inhibiteurs dérivés de RKS262 sont actuellement en phase II d'essais cliniques.

Les inhibiteurs de la transduction de signal touchent des récepteurs aux facteurs de croissance ou bien des tyrosines kinases. Les récepteurs aux facteurs de croissance sont surexprimés dans certains types de cancers et sont à l'origine de la stimulation de la prolifération et de la survie des cellules tumorales. Dans 20% des cancers du sein, le récepteur HER2 (*Human Epidermal growth factor Receptor 2*) appartenant à la famille des récepteurs à l'EGF (*Epidermal Growth Factor*) est surexprimé. Des anticorps antagonistes de l'EGF tels que le Trastuzumab (ou Herceptin®) ont été développés : ils sont capables de lier HER2, de l'empêcher de transduire un signal intracellulaire passant notamment par l'activation d'Akt et ainsi d'induire l'apoptose (Jones and Buzdar, 2009). Le Trastuzumab est également capable de médier la reconnaissance des cellules tumorales par les cellules Natural Killer permettant une élimination des cellules tumorales HER2-positive par le système immunitaire (Jones and Buzdar, 2009; Junttila et al., 2009; Nagata et al., 2004).

HER2 tout comme d'autres récepteurs à activité tyrosine kinase (tel que PDGFR pour *Platelet Derived Growth Factor Receptor*) ainsi que des tyrosines kinases cytosoliques (tel que les kinases ABL pour *ABeLson*, ou Src) peuvent être à l'origine de cancers en cas d'activation constitutive. **Des agents inhibiteurs des tyrosines kinases** ont donc été développés pour traiter ces types de cancers. Les leucémies myéloïdes chroniques sont généralement des cancers répondants bien à ce type de thérapies car elles présentent une activation constitutive de la kinase ABL suite à la formation du chromosome de philadelphie (résultant d'une translocation entre les chromosomes 9 et 22). Cette fusion chromosomique a pour résultat la fusion des gènes *bcr* (*Breakpoint Cluster Region*) et *abl*, et la production de la

kinase BCR-ABL constitutivement active qui conduit à la transformation des progéniteurs hématopoïetiques. Depuis 2002, le traitement principal de ces leucémies est l'imatinib (ou Glivec®) et deux traitements dérivés ont depuis vu le jour : le nilotinib et le dasatinib. Ces agents inhibent principalement l'activité de la kinase BCR-ABL mais ciblent également le PDGFR et les kinases Src permettant ainsi de ramener à la normale le taux actif de ces protéines kinases dans le tissu tumoral et de limiter la prolifération cellulaire. Le problème majeur de ces inhibiteurs des tyrosines kinases est leurs effets secondaires. En effet, les PDGFR et la kinase ABL sauvages sont nécessaires au métabolisme osseux, pulmonaire et cardiaque, et leur inhibition peut provoquer une fragilité osseuse, des effusions pleurales ou bien des complications cardiaques chez 10 à 60% des patients (Giles et al., 2009).

Enfin, **les hormonothérapies** s'adressent aux tumeurs exprimant fortement les récepteurs aux hormones stéroïdiennes (*Estrogen Receptor* et *Progesterone Receptor*) telles que le sein, l'ovaire, l'utérus ou bien encore les testicules. La plupart de ces cancers sont dits hormono-sensibles car leur croissance est stimulée par les hormones. Il existe donc des thérapies capables de bloquer la formation des hormones (par exemple les anti-aromatases qui empêchent la conversion des androgènes surrénaliennes en oestrogènes), ou de bloquer la fixation des hormones sur leurs récepteurs à l'aide d'antagonistes tels que le tamoxifène capable de lier le récepteur aux oestrogènes induisant un blocage du cycle cellulaire et la mort cellulaire par activation de c-Jun (Madeo et al., 2009). De la même manière, **les traitements anti-angiogéniques** s'adressent aux tumeurs vascularisées présentant une forte expression de VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), principal facteur de croissance des cellules endothéliales. Le Bevacizumab (Avastin®), un anticorps monoclonal capable de titrer le VEGF circulant et empêchant sa liaison sur les récepteurs au VEGF présents à la surface des cellules endothéliales est utilisé pour le traitement des cancers colorectaux métastatiques, des cancers mammaires en association avec des chimiothérapies et induit une régression tumorale (Hurwitz et al., 2004; Miller et al., 2007).

L'ensemble de ces protéines et hormones spécifiquement exprimées par les tumeurs représentent ainsi des marqueurs tumoraux qui vont être particulièrement utiles pour le traitement des cancers en termes de pronostic (choix d'un traitement en fonction des marqueurs exprimés par la tumeur) et d'évaluation de l'efficacité d'un traitement (par exemple par le suivi du taux de marqueur sanguin pour voir si la tumeur répond au traitement ou non).

Actuellement, les traitements les plus efficaces combinent les thérapies classiques (chimiothérapie/radiothérapie) et les thérapies ciblées. Toutefois, des phénomènes de

résistances liés à l'acquisition de mutations des cibles thérapeutiques apparaissent. Par exemple, l'anticorps monoclonal Trastuzumab ciblant HER2 devient inefficace si l'épitope qu'il reconnaît est muté (Jones and Buzdar, 2009) ; et ces mutations acquises conduisent à l'émergence de nouvelles tumeurs ne répondant pas au traitement initial. Un autre problème est la toxicité de certaines de ces thérapies ciblées qui rendent certains traitements difficiles à supporter pour les patients (Imatinib et ses dérivés en particulier).

C. Thérapies ciblées induisant directement l'apoptose des cellules cancéreuses

Actuellement, des thérapies visant à restaurer directement les voies pro-apoptotiques sont en cours d'essais cliniques : les principales ciblent les récepteurs TRAIL-R exprimés par les cellules tumorales. Ces thérapies combinées avec les autres thérapies ciblées et/ou avec les thérapies classiques sont une nouvelle source d'espoir pour le traitement des cancers.

1. Les avancés majeures sur TRAIL et ses agonistes

Comme nous l'avons vu précédemment, TRAIL et ses récepteurs TRAIL-R1 et TRAIL-R2 jouent un rôle majeur dans le contrôle de la tumorigenèse *in vitro* et *in vivo*. La signalisation pro-apoptotique médiée par TRAIL est ainsi devenue une cible de choix pour le traitement ciblé des cancers et plusieurs agonistes de TRAIL ont été développés. Contrairement à la chimiothérapie ou la radiothérapie seule, les agonistes de TRAIL induisent spécifiquement la mort des cellules tumorales *in vitro* et voient leur efficacité potentialisée si ils sont combinés avec de faibles doses de chimiothérapies/radiothérapies (Holoch and Griffith, 2009). Ainsi, leur intérêt thérapeutique est particulièrement important car ces agonistes permettraient d'obtenir un effet ciblé sur la tumeur avec des effets secondaires bien moins importants qu'avec les traitements classiques (absence d'alopécie, d'anémie, de nausées, etc).

Ces dernières années, plusieurs thérapies basées sur l'utilisation d'une molécule recombinante (rhTRAIL) ou d'anticorps agonistes de TRAIL (mapatumumab, lextumumab, apomab) ont été développées et sont actuellement en essais cliniques de phase I ou II. Malgré une faible toxicité de tels traitements (quelques rares cas de toxicité hépatique) chez les patients, qui rend ces agonistes attrayants pour une thérapie, l'effet des agonistes TRAIL sur la régression tumorale est très modéré. En effet, utilisés seuls ces traitements induisent un arrêt de la croissance d'environ 50% des tumeurs traitées (prostate, colon, poumon non à petites cellules) mais aucune régression tumorale. Utilisés en combinaison avec les

chimiothérapies classiques, une régression de 10% à 15% des tumeurs traitées est observée (Holoch and Griffith, 2009).

Un nouveau type de thérapie est actuellement en cours de développement pour le traitement du cancer de la prostate. Cette thérapie est basée sur l'injection par voie intra-tumorale d'un adénovirus vecteur du gène *trail* (Ad5-TRAIL). Cet adénovirus est très bien toléré par les patients et semble capable d'induire à lui seul une apoptose massive des cellules tumorales. Les futures études sur un nombre plus grand de patients permettront de voir quel effet a véritablement ce traitement sur la régression tumorale (Holoch and Griffith, 2009).

2. Les antagonistes des protéines anti-apoptotiques Bcl-2

Plusieurs traitements visant à neutraliser les protéines inhibitrices de l'apoptose de la famille Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-$_{XL}$ et Mcl-1) ont été développés et sont en cours de test : le gossypol et ses dérivés, l'obatoclax mesylate et un ARN antisens ciblant Bcl-2. Les deux premiers inhibiteurs sont des molécules chimiques capables de fixer Bcl-2, Bcl-$_{XL}$ et Mcl-1 et de les inhiber *in vitro*. Les premiers essais de phase I du gossypol réalisés en 2001 n'ont pas révélé d'effet anti-tumoral de cette molécule sur des patients atteints de leucémies (Bushunow et al., 1999; Tan et al., 2009). Depuis 2006, deux nouveaux dérivés du Gossypol ont été testés (phase I) : l'Apo2G et l'AT101 et seraient efficaces pour le traitement des lymphomes et des leucémies myéloïdes chroniques (Balakrishnan et al., 2009; Kline et al., 2008; Tan et al., 2009; Zerp et al., 2009). L'obatoclax mesylate a un mode d'action similaire et est récemment entré en phase I d'essais cliniques (2008) (O'Brien et al., 2009; Schimmer et al., 2008).

Les essais les plus avancés sur Bcl-2 concernent l'Oblimersen Sodium, un petit ARN antisens de 18-mer stabilisé par modification chimique et capable de s'hybrider avec l'ARNm de Bcl-2 et de conduire à sa dégradation (Bedikian et al., 2006). Cette thérapie est actuellement en essai de phase III et a démontré son efficacité pour le traitement des mélanomes et des leucémies lymphoïdes chroniques (CLL). Les études en cours cherchent à déterminer si ce traitement potentialise l'effet des médicaments chimiothérapeutiques. Les premiers résultats indiquent que l'Oblimersen Sodium a un effet potentialisant tissu dépendant : il a un effet marqué sur les patients atteints de mélanomes et au contraire un effet mineur à nul sur les CLL et les cancers du poumon non à petites cellules (Tan et al., 2009).

A l’heure actuelle, il n’existe donc pas sur le marché de traitement capable de restaurer l’apoptose des cellules tumorales même si de nombreux traitements –notamment sur TRAIL et Bcl-2- sont en cours de développement. L’efficacité des traitements basés sur TRAIL est limitée sans doute parce que les cellules tumorales sont capables de développer des résistances suite à la mutation de protéines essentielles au fonctionnement des voies pro-apoptotiques médiées par TRAIL ou bien à cause de l’expression des Decoy Receptor TRAIL-R3 et TRAIL-R4. Concernant les traitements Bcl-2, les traitements les plus avancés ne représentent véritablement pas de bénéfices par rapport aux chimiothérapies pré-existantes en termes d’efficacité de traitement. Il est donc nécessaire de trouver de nouvelles pistes de traitement. Une nouvelle piste est le ciblage de nouvelles voies pro-apoptotique comme celle médiée par les récepteurs à dépendance. Ces voies sont actuellement assez mal décrites du point de vue de leur signalisation mais ont déjà révélé leur implication dans le contrôle de la tumorigenèse. Leur étude présente donc un intérêt particulier car elle pourrait permettre l’identification de nouvelles cibles thérapeutiques.

Chapitre II : Signalisation pro-apoptotique des récepteurs à dépendance : de nouvelles perspectives thérapeutiques ?

I. La famille des récepteurs à dépendance

A. P75^{NTR} le membre commun aux récepteurs de mort et récepteurs à dépendance

De manière générale, les récepteurs transmembranaires sont capables de transduire un signal intracellulaire uniquement lorsqu'ils sont liés à leur ligand. C'est par exemple ainsi que les récepteurs de mort induisent l'apoptose comme nous l'avons vu précédemment.

Toutefois, au sein de la superfamille des récepteurs au TNF, le rôle de récepteur de mort de p75^{NTR} est fortement remis en question. Il a été montré *in vitro* que p75^{NTR} était un récepteur de mort car il est capable d'induire en présence de NGF l'apoptose de motoneurones, de précurseurs de cellules sympathiques ou encore de lignées de neuroblastomes (Bredesen et al., 2005; Salehi et al., 2000; Sedel et al., 1999). De façon contradictoire, il a été démontré dans d'autres types cellulaires *in vitro* et *in vivo* que le récepteur p75^{NTR} était capable d'induire un signal de survie cellulaire en présence de son ligand et un signal de mort cellulaire en absence de son ligand le NGF remettant en question sa fonction unique de récepteur de mort et démontrant également qu'un récepteur peut être actif et induire l'apoptose en absence de ligand (Bredesen et al., 2006; Rabizadeh et al., 1993).

En effet, il a été montré que p75^{NTR} en s'associant avec un autre récepteur au NGF : TrkA, était capable d'induire la mort de neurones privés de NGF en culture (Bredesen et al., 2005; Yeo et al., 1997). Toutefois, TrkA ne semble pas essentiel à cette fonction pro-apoptotique de p75^{NTR} *in vivo* car les souris mutantes pour p75^{NTR} (P75$^{NTR-/-}$) présentent un nombre accru de neurones cholinergiques et une hyper-innervation de l'hippocampe. A l'inverse, les souris hétérozygotes pour le NGF (NGF$^{+/-}$) présentent une réduction du nombre de neurones cholinergiques (Bredesen et al., 2005; Naumann et al., 2002). Ainsi, ces deux phénotypes soulignent l'implication de p75^{NTR} et du NGF dans la survie neuronale et mettent en évidence un nouveau rôle pro-apoptotique du récepteur p75^{NTR} en absence de son ligand le NGF.

B. Les autres récepteurs à dépendance

En parallèle de $p75^{NTR}$, un autre récepteur transmembranaire avec cette double fonctionnalité pro ou anti-apopoptotique, dépendante de la fixation du ligand a été caractérisé: le récepteur DCC (*Deleted in Colorectal Carcinoma*). Ce dernier est en effet capable d'induire la mort cellulaire en absence de son ligand la Nétrine-1 et au contraire d'induire un signal de survie, de prolifération et de migration cellulaire en présence de son ligand (Mehlen et al., 1998). La dualité de fonctionnement de $p75^{NTR}$ et DCC a pour conséquence un état de dépendance de la cellule à la présence de ligand pour survivre d'où leur nomination de récepteurs à dépendance.

Depuis ces travaux, 14 autres récepteurs à dépendance ont été identifiés : les récepteurs UNC5H1, UNC5H2, UNC5H3 et UNC5H4(*Uncoodinated 5 Homologous*), Ptc (*Patched*), Néogénine, AR (*Androgen Receptor*), les intégrines $\alpha_V ß_3$ et $\alpha_5 ß_1$ ainsi qu'un groupe de récepteurs à activité tyrosine kinase : EphA4 (*Ephrin A4*), TrkC (*Tropomyosin-like receptor kinase C)*, RET (*REarranged during Transfection*), ALK (*Anaplastic Lymphoma Kinase*), et MET (**figure 10**)(Mehlen, 2005; Mehlen and Guenebeaud, 2009). A l'exception du récepteur aux androgènes, les récepteurs à dépendance sont transmembranaires.

Ces récepteurs ont pour ligand respectif le NGF ($p75^{NTR}$), la Nétrine-1 (DCC et UNC5H1-4), Sonic Hedgehog (Ptc), RGM (*Repulsive Guidance Molecule* pour Néogénine), les androgènes (AR), la matrice extracellulaire (intégrines), EphrineB3 (EphA4), la neurotrophine-3 (TrkC), le GDNF (*Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor* pour RET), et HGF/SF (*Hepatocyte growth factor-scatter factor* pour MET) (**figure 10**)(Mehlen, 2005).

Le ligand du récepteur à dépendance ALK n'a pour l'instant pas été identifié chez l'Homme. A l'heure actuelle, un candidat a été décrit chez la drosophile : la protéine Jelly belly (Jeb). Cette protéine s'exprime dans les mêmes tissus que l'homologue du récepteur ALK chez la drosopile : DALK (*Drosophila ALK*), et la perte de fonction de Jelly Belly ou DALK donne un phénotype similaire caractérisé par un développement anormal du mésoderme viscéral et du lobe optique (Allouche, 2007; Bazigou et al., 2007). En outre, des études *in vitro* ont montré que Jelly belly interagit et active ALK stimulant ainsi la différenciation puis la fusion des muscles viscéraux et confirmant que Jelly belly est un ligand de ALK chez la drosophile (Englund et al., 2003; Lee et al., 2003). L'homologue fonctionnel de Jelly belly chez les mammifères reste à identifier et il semblerait que sa structure ne soit pas conservée car il a été montré que la protéine Jelly belly ne permet pas d'activer la protéine ALK murine dans des cellules en culture (Yang et al., 2007a).

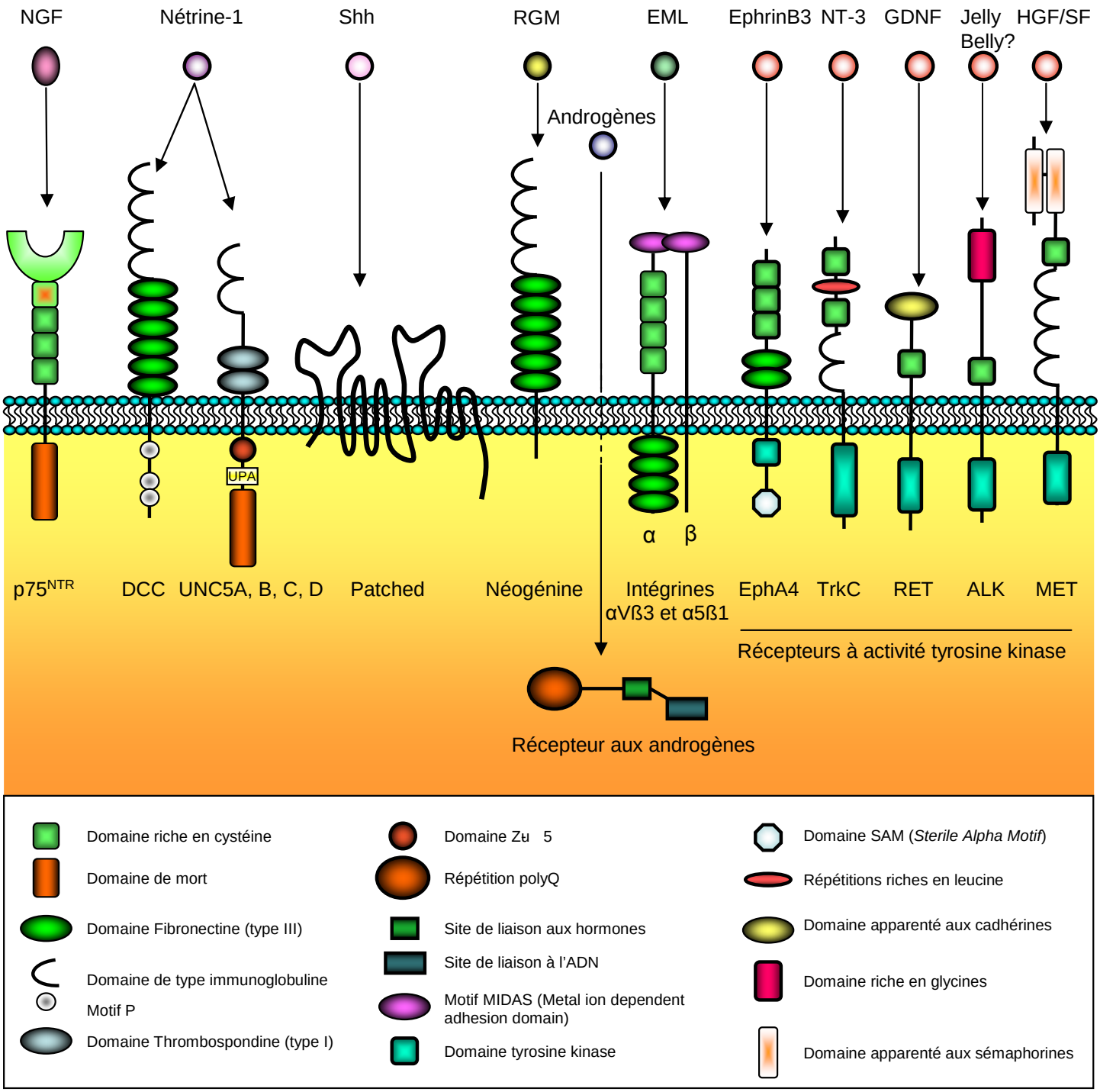


Figure 10 : Structure de la famille des récepteurs à dépendance

Bien que partageant un mode de fonctionnement commun, les récepteurs à dépendance ne représentent pas une famille structurale comme illustré ici.

II. Signalisation des récepteurs à dépendance

Les récepteurs à dépendance sont tous capables d'induire deux types de signalisation. En présence de leur ligand, ces récepteurs sont capables d'induire une signalisation dîte « positive » aboutissant à la stimulation de la prolifération, de la survie ou bien encore de la migration cellulaire. Au contraire, en absence de leurs ligands, les récepteurs à dépendance induisent une signalisation dite « négative » ou pro-apoptotique. Alors que les récepteurs à dépendance en présence de leurs ligands participent à de nombreux processus physiologiques tels que le guidage axonal ou bien encore la migration cellulaire expliquant la divergence des voies de signalisation positives (comme nous le verrons par la suite pour les récepteurs DCC et UNC5H), ils induisent tous l'apoptose en absence de leur ligand selon un mécanisme assez commun.

A. Points communs des récepteurs à dépendance : les étapes de leur signalisation apoptotique

1. Chronologie de l'induction de l'apoptose par les récepteurs à dépendance

Deux étapes sont essentielles à l'induction de l'apoptose par les récepteurs à dépendance en absence de leur ligand (**figure 11**) : (i) un clivage du domaine intracellulaire par des protéases telles que la caspase 3 qui permet l'exposition d'un domaine ADD (*Addiction/Dependence Domain*) et (ii) le recrutement de partenaires pro-apoptotiques par cet ADD (**figure 11**) qui vont conduire à l'activation des caspases effectrices dont la caspase 3 et ainsi à une boucle d'amplification positive du signal apoptotique.

Il est à souligner que le clivage par la caspase 3 *in vitro* est un évènement commun et indispensable à l'induction de l'apoptose par l'ensemble des récepteurs à dépendance (non-déterminé pour les intégrines $\alpha_V ß_3$ et $\alpha_5 ß_1$ et $p75^{NTR}$). En effet, la mutation du site de clivage par la caspase 3 (D→N) conduit à une perte de la fonction pro-apoptotique des récepteurs indiquant que cette étape est précoce dans la voie de signalisation et critique pour l'induction de l'apoptose. De plus sous certaines conditions, la mutation du site de clivage donne naissance à une activité dominant négatif des récepteurs mutés. Par exemple, le domaine intracellulaire muté du récepteur UNC5H2 (UNC5H2-IC-D412N) inhibe *in vitro* la signalisation apoptotique induite par l'ensemble des récepteurs UNC5H et de même, le domaine intracellulaire muté de la protéine DCC (DCC-IC-D1290N) inhibe la voie de signalisation apoptotique induite par DCC (Llambi et al., 2005; Mehlen et al., 1998).

Récepteur à dépendance	En absence de ligand					Références
	Clivage par la caspase 3 (in vitro)	Site de clivage (in vitro)	Protéines recrutées par l'ADD	Caspase initiatrice activée	Complexe d'activation des caspases	
p75NTR	oui	ND	NRAGE ?	ND	apoptosome	(Nishio et al., 2004; Rabizadeh et al., 1993)
DCC	oui	D1290	APPL1	caspase 9	indépendant de l'apoptosome	(Furne et al., 2006; Herincs et al., 2005; Mille et al., 2009)
UNC5H1	oui	D412	NRAGE, DAPK?	ND	ND	(Llambi et al, 2005 ; Maisse et al., 2008; Mille et al., 2009)
UNC5H2	oui	D412	DAPK	ND	ND	(Llambi et al, 2005 ; Maisse et al., 2008; Mille et al., 2009)
UNC5H3	oui	D412	DAPK?	ND	ND	(Llambi et al, 2005 ; Maisse et al., 2008; Mille et al., 2009)
UNC5H4	oui	D412	ND	ND	ND	(Wang et al, 2008)
Ptc	oui	D1392	DRAL/TUCAN	caspase 9	DRALosome	(Karpen et al., 2001; Thibert et al., 2003)
Néogénine	oui	D1323	DAPK	ND	ND	(Matsunaga et al., 2004)
AR	oui	D146	ND	caspase 9 ?	apoptosome ?	(Ellerby et al., 1999)
intégrines αVß3 et α5ß1	ND	ND	ND	ND	ND	(Stupack et al., 2001)
EphA4	oui	D773/774	ND	caspase 8	indépendant du DISC	(Furne et al., 2009; Stapleton et al., 1999)
TrkC	oui	D465 et D641	ND	ND	ND	(Philo et al., 1994; Tauszig-Delamasure et al., 2007)
RET	oui	D707 et D1017	ND	ND	ND	(Bordeaux et al., 2000; Freche et al., 2005)
ALK	oui	D1160	ND	caspase 9	apoptosome	(Allouche, 2007; Bischof et al., 1997)
MET	oui	D1000	ND	ND	ND	(Tulasne et al., 2004)

Figure 11 : Tableau récapitulatif des principales étapes de signalisation des récepteurs à dépendance.

En absence de leurs ligands, les récepteurs à dépendance sont clivés par la caspase 3 (à l'exception des intégrines et de p75NTR) ce qui permet l'exposition de leur domaine ADD et le recrutement via ce domaine de protéines pro-apoptotiques. Dans le cas des récepteurs UNC5H, il a été montré que la DAPk était capable d'interagir avec UNC5H1, UNC5H2 et UNC5H3 mais la démonstration de son intervention fonctionnelle n'a été réalisée que pour le récepteur UNC5H2

[ND : non déterminé ; - : non analysable car récepteur cytoplasmique].

Cette activation de la caspase 3 reste à confirmer *in vivo* et son caractère précoce dans la signalisation apoptotique est sujet à controverse. En effet, il est admis que les caspases sont activées en réponse à un stimulus apoptotique et il peut paraître paradoxal que l'activité de la caspase 3 soit une étape initiatrice de l'apoptose médiée par les récepteurs à dépendance. Toutefois, il existe une classe de protéines inhibant les caspases en absence de stimuli apoptotique : les IAPs, suggérant qu'il existe à l'état normal une activité caspase basale insuffisante à l'induction de l'apoptose mais qui pourrait être suffisante au clivage des récepteurs à dépendance en absence de ligand.

2. Définition et structure des domaines ADD

Le clivage des récepteurs en absence de ligand permet l'exposition des domaines ADD qui ont une localisation et une structure variable ne comprenant pas nécessairement de domaines d'homologies : ils peuvent correspondre au fragment issu du clivage par les caspases dans le cas des récepteurs UNC5H, RET, TrkC, et MET (**figure 12**)(Bordeaux et al., 2000; Llambi et al., 2001; Tauszig-Delamasure et al., 2007; Tulasne et al., 2004; Wang et al., 2008), ou bien correspondre au domaine intracellulaire situé en amont du site de clivage comme pour les récepteurs DCC, Néogénine, EphA4, Alk et Ptc (**figure 12**) (Ellerby et al., 1999; Furne et al., 2009; Matsunaga et al., 2004; Mehlen et al., 1998; Mourali et al., 2006; Thibert et al., 2003). Les domaines ADD du récepteur aux androgènes, de $p75^{NTR}$ et des intégrines n'ont pour l'instant pas été clairement identifiés. Il semble que le pouvoir pro-apoptotique du récepteur aux androgènes soit directement lié à une expansion polyglutamique en N-terminal (Ellerby et al., 1999). Le clivage par la caspase 3 pourrait permettre la libération de ce fragment et être à l'origine de la fonction pro-apoptotique du récepteur aux androgènes (LaFevre-Bernt and Ellerby, 2003; Young et al., 2009). Enfin, le site de clivage des intégrines et de $p75^{NTR}$ par les caspases n'a pas été identifié mais les domaines responsables du pouvoir pro-apoptotique de ces récepteurs seraient un domaine situé sur les chaines β à un niveau sous-membranaire pour les intégrines, et le domaine intracellulaire pour $p75^{NTR}$ (**figure 12**)(Bredesen et al., 2005; Stupack et al., 2001).

3. Activation des caspases par les domaines ADD.

Les domaines ADD ayant une structure variable, cela suggère que chaque récepteur à dépendance recrute des partenaires pro-apoptotiques propres. Toutefois, plusieurs récepteurs à dépendance activent des complexes d'activation des caspases initiatrices décrits

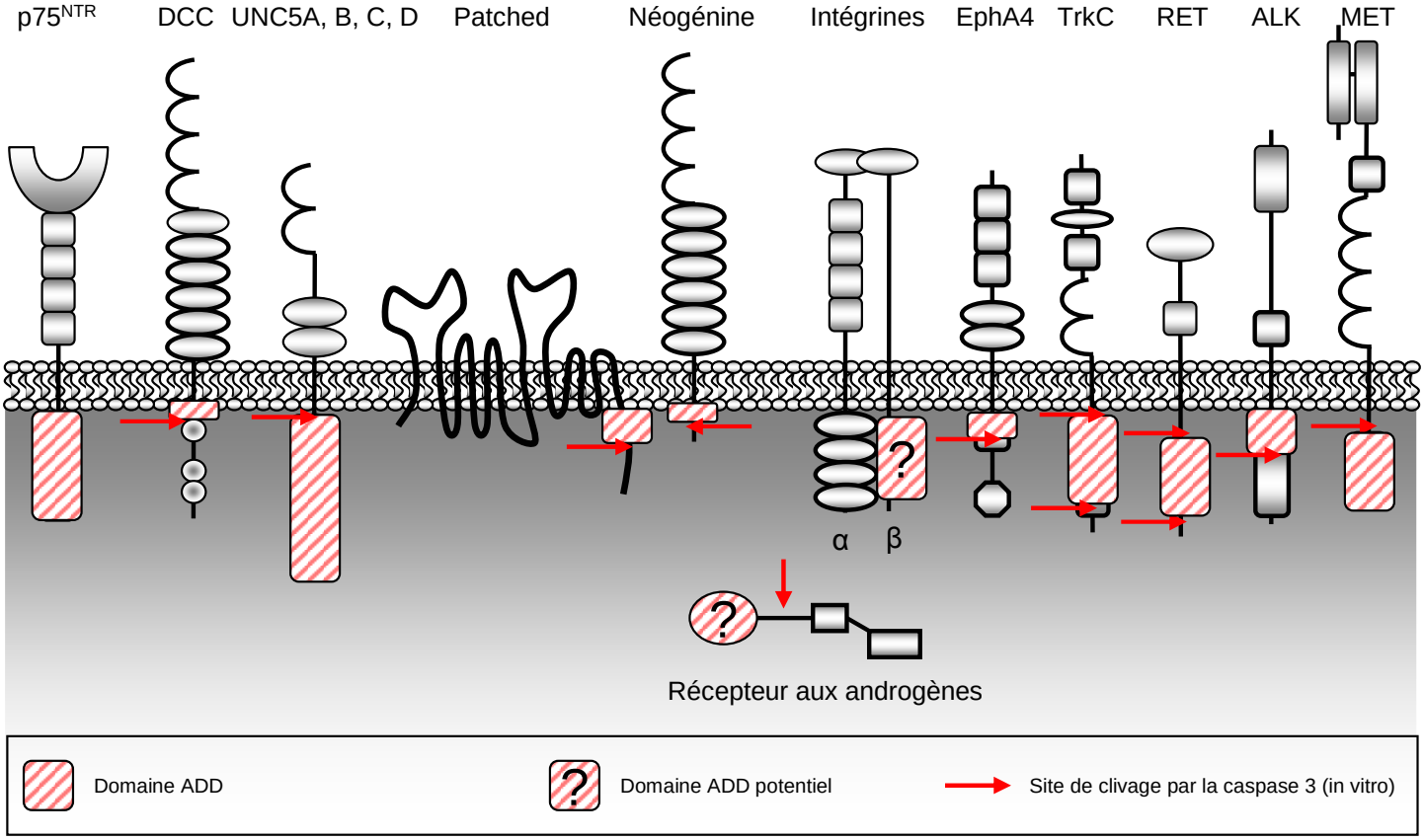


Figure 12 : Localisation des sites de clivage, des domaines ADD et résumé des connaissances actuelles sur la signalisation apoptotique des récepteurs à dépendance.

En absence de leurs ligands respectifs, les récepteurs à dépendance sont clivés et exposent un domaine ADD. Ce dernier correspond à un domaine en amont du site de clivage ou bien à un fragment protéique libéré par le clivage. Dans le cas des intégrines, et du récepteur aux androgènes, les domaines ADD représentés sont hypothétiques, leur implication dans le processus apoptotique restant à démontrer.

précédemment (voir Chapitre I), ou bien recrutent les mêmes protéines pro-apoptotiques (cf. **figure 11**).

Ainsi, en absence de leur ligand, ALK et le récepteur aux androgènes sont capables d'induire la formation de l'apoptosome (Allouche, 2007; LaFevre-Bernt and Ellerby, 2003; Young et al., 2009). Il est à noter que dans le cas du récepteur aux androgènes, l'activation de l'apoptosome n'a été observée qu'en condition pathologique (maladie de Kennedy) suite à l'expansion du domaine polyglutamine du récepteur. Ce domaine serait libéré en absence de ligand après clivage par la caspase 3 et a une forte activité cytotoxique via l'induction de la voie intrinsèque induisant notamment une dégénérescence neuromusculaire (Young et al., 2009). Les protéines $P75^{NTR}$ et UNC5H1 sont capables d'induire l'apoptose suite au recrutement de la protéine NRAGE ; protéine capable d'induire l'activation de la voie JNK, la formation de l'apoptosome et l'activation de la caspase 9 (Salehi et al., 2000; Williams et al., 2003a).

Au contraire, d'autres récepteurs à dépendance activent les caspases au sein de complexes qui leurs sont propres. Ainsi, le récepteur DCC est capable d'activer la caspase 9 dans des cellules déficientes pour Apaf-1 et donc de manière apoptosome-indépendante (Mehlen et al., 1998) et les intégrines sont capables d'activer la caspase 8 indépendamment de la formation du DISC (Stupack et al., 2001). Enfin, Ptc est capable d'activer la caspase-9 au sein d'un nouveau complexe d'activation des caspases comprenant les protéines DRAL et TUCAN : le DRALosome, sans l'intervention d'Apaf-1 ou du cytochrome C (**figure 11**)(Mille et al., 2009b).

D'autre part, les récepteurs Néogénine et UNC5H2 sont capable d'induire l'apoptose suite au recrutement de la DAPk à l'origine de l'activation de la caspase 3 (*Death Associated Protein Kinase*) (mécanisme détaillé dans le paragraphe III.C.2 p45) (Fujita et al., 2008; Llambi et al., 2005).

Enfin, il est à noter que le récepteur Ptc est également capable en absence de son ligand d'induire une inhibition transcriptionnelle en inhibant les facteurs activateurs de transcription Gli (*Glioma*) régulant des gènes inhibiteurs de l'apoptose tels que *bcl-2* (Cayuso et al., 2006; Rahnama et al., 2006).

B. Régulation du switch survie cellulaire/apoptose

En absence de ligand, les récepteurs à dépendance sont clivés exposant alors leur domaine ADD, étape indispensable à l'induction de l'apoptose. Pour expliquer pourquoi ce phénomène ne se produit qu'en absence de ligand, une hypothèse est que les sites de clivage

des récepteurs à dépendance sont masqués ou inaccessibles pour les caspases lorsque le ligand est fixé sur son récepteur. Plusieurs modifications des récepteurs à dépendance – actuellement décrites essentiellement pour les récepteurs UNC5H et/ou DCC- peuvent être à l'origine de ce masquage : (i) leur oligomérisation, (ii) leur localisation en dehors des rafts (iii) une modification de leur conformation et/ou (iv) leur phosphorylation.

1. Régulation par oligomérisation

En présence de Nétrine-1, il a été montré que les récepteurs UNC5H et DCC étaient capable de s'oligomériser, phénomène inhibant l'induction de l'apoptose. En effet, il a été montré par des expériences de co-immunoprécipitations en présence de Nétrine-1 que les récepteurs DCC et UNC5H2 étaient capables de former des homo-oligomères ; phénomène amplifié en présence de Nétrine-1. De plus, il a été montré par des tests de mort *in vitro* que la dimérisation forcée de DCC ou du récepteur UNC5H2 inhibait le pouvoir pro-apoptotique de ces deux récepteurs à dépendance (Mille et al., 2009a). Il est à noter que ce phénomène d'oligomérisation en présence de ligand est conservé par les récepteurs à activité tyrosine kinase (i.e : RET, TrkC, ALK, MET et EphA4) qui sont capables de s'homodimériser en présence de leur ligand. Par ailleurs, le récepteur $P75^{NTR}$ est capable de former des hétéro-oligomères avec le récepteur TrkA en présence de son ligand le NGF et le récepteur EphA4 serait également capable de former des homo-oligomères via une interaction entre les domaines intracellulaires SAM (Stapleton et al., 1999).

2. Régulation par la localisation dans les rafts

Bien qu'il ait été montré pour les récepteurs UNC5H et DCC qu'une localisation dans les rafts était indispensable à l'induction de l'apoptose et en particulier pour l'activation de la DAPk dans le cas du récepteur UNC5H2 ; dans le cas de DCC, cette même localisation est également indispensable à l'activation de la voie de signalisation positive en présence de Nétrine-1 (Furne et al., 2006; Herincs et al., 2005; Maisse et al., 2008). Ainsi, il semble que le changement de localisation membranaire (i.e. exclusion ou inclusion dans les rafts) ne soit pas un élément déterminant pour la fonction pro ou anti-apoptotique des récepteurs à dépendance. De plus, l'importance de la localisation des autres récepteurs à dépendance pour leur fonction pro-apoptotique n'a pour l'instant pas été démontrée.

3. Régulation par modification conformationnelle du récepteur

En revanche, il a été montré récemment par des analyses de cristallographie que le domaine intracellulaire du récepteur UNC5H2 est capable d'adopter deux conformations directement liée à son pouvoir pro-apoptotique. En effet, le récepteur UNC5H2 serait capable d'adopter une conformation « fermée » non-apoptotique où le domaine de mort interagissant serait masqué via son interaction avec un autre domaine appelé ZU-5 formant un « supramodule » inhibiteur de l'apoptose. En effet, ce masquage du domaine ADD est associé à la perte de fonction apoptotique du récepteur UNC5H2, phénomène qui pourrait être lié à une inhibition du recrutement de partenaires pro-apoptotiques. Par ailleurs, le domaine intracellulaire du récepteur UNC5H2 est capable d'adopter une conformation « ouverte » pro-apoptotique où le supramodule disparaît et permet une libération du domaine de mort, et l'induction de l'apoptose via le recrutement de partenaires pro-apoptotiques (**figure 13**). Le rôle de la Nétrine-1 sur cette modification conformationnelle reste à étudier et une hypothèse est que cette conformation est sous le contrôle d'un mécanisme de phosphorylation Nétrine-1 dépendant. Par ailleurs, ce mécanisme de régulation n'a pour l'instant pas été mis en évidence pour les autres récepteurs à dépendance.

4. Régulation par phosphorylation

Il a été montré qu'en présence de Nétrine-1, le récepteur UNC5H2 est phosphorylé sur son domaine intracellulaire, de part et d'autre du domaine ZU-5 (Y449, Y454, Y649 et Y667) par les tyrosines kinases Fyn, FAK, et Src et que cette phosphorylation est à l'origine de la perte de fonction apoptotique du récepteur UNC5H2 (Ren et al., 2008). Ainsi, il serait particulièrement intéresant d'étudier l'influence de cette phosphorylation sur la conformation du domaine intracellulaire du récepteur UNC5H2.

De manière similaire, en présence de leurs ligands, les intégrines et DCC (Y1420) sont phosphorylés par Src et FAK médiant ainsi la survie et la migration cellulaire (Courter et al., 2005; Eliceiri et al., 2002; Li et al., 2006b; Ren et al., 2004; Wu et al., 2008). Il a également été montré que l'activité pro-apoptotique du récepteur aux androgènes était régulée par phosphorylation sur la sérine 514 ce qui empêche le clivage par la caspase 3 et l'induction de l'apoptose. *In vitro*, il semble que la protéine kinase responsable de cette phosphorylation soit la protéine MEK1/2 car l'utilisation d'un inhibiteur de cette kinase (U0126) bloque la phosphorylation et restaure le pouvoir pro-apoptotique du récepteur aux androgènes (LaFevre-Bernt and Ellerby, 2003).

En résumé, en absence de leur ligand, les récepteurs à dépendance sont clivés par les caspases ce qui permet l'exposition de leur domaine ADD et le recrutement de partenaires

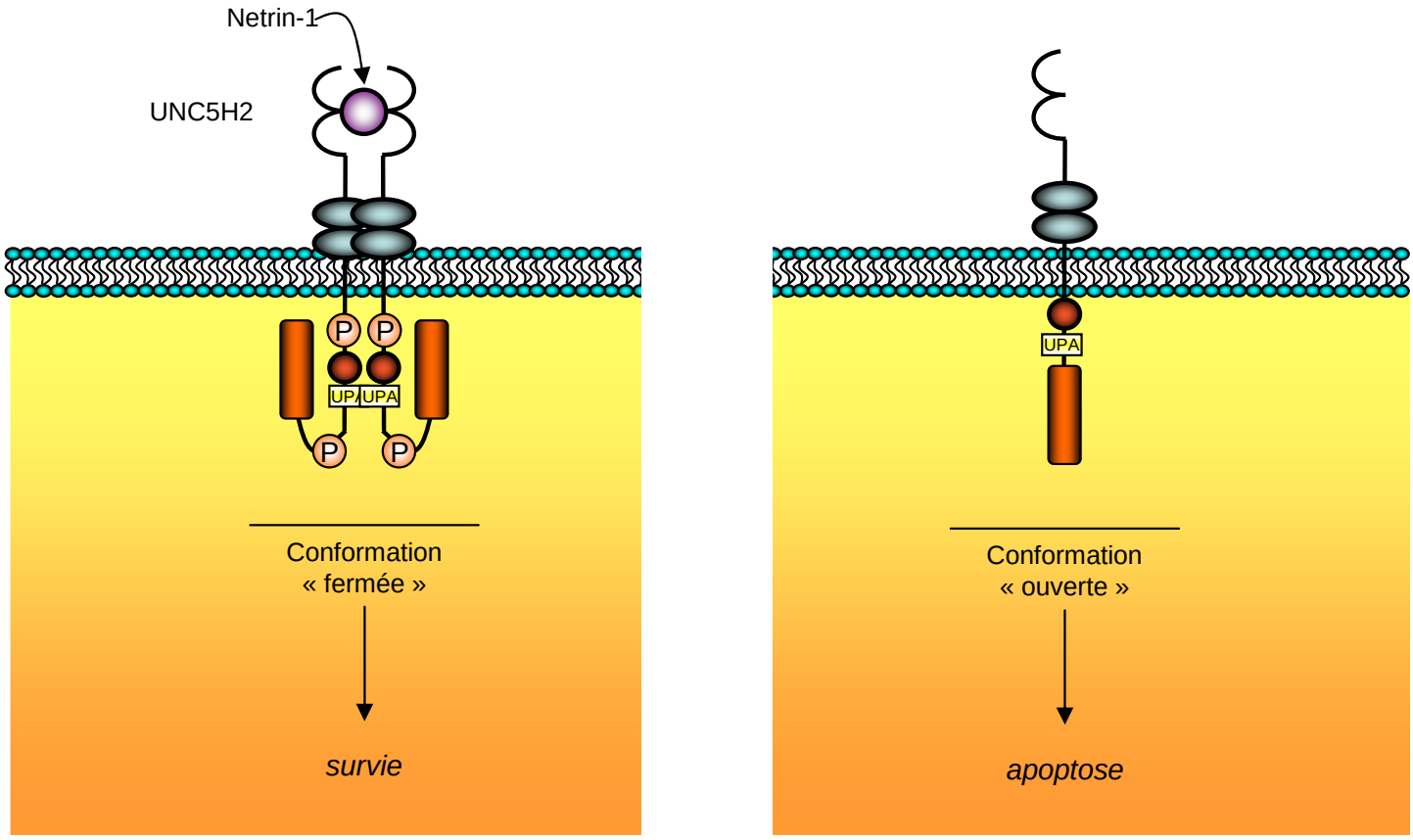


Figure 13: Modification conformationnelle d'UNC5H2 et de son pouvoir apoptotique induit par la Nétrine-1

En présence de Nétrine-1, UNC5H2 adopte une conformation fermée/anti-apoptotique où son domaine ZU-5 et son domaine de mort interagissent. Sous cette forme le récepteur est phosphorylé et induirait la voie de signalisation positive. Au contraire, en absence de Nétrine-1, le récepteur adopte une conformation ouverte et induit l'apoptose.

pro-apoptotiques. Ces évènements peuvent être régulés par de nombreux mécanismes impliqués plus particulièrement dans la signalisation des récepteurs UNC5H2 et DCC. Ces récepteurs à la Nétrine-1 étant parmi les premiers récepteurs à dépendance caractérisé, il est probable que des éléments régulateurs communs seront bientôt identifiés pour les autres récepteurs à dépendance plus récemment identifiés. De plus, de part l'implication des récepteurs DCC et UNC5H et leur ligand dans la tumorigenèse, il n'est pas étonnant que leur signalisation soit particulièrement documentée comme nous allons le voir.

III. La Nétrine-1 et ses récepteurs : structures et signalisations induites par les récepteurs DCC et UNC5H

Les récepteurs à Nétrine-1 étant les prototypes des récepteurs à dépendance, je vais plus particulièrement développer les connaissances actuelles sur la signalisation et sur le rôle physiologique des récepteurs DCC et UNC5H.

A. Structure des récepteurs à la Nétrine-1 et de leur ligand

1. Structure de la Nétrine-1

La famille des Nétrines regroupe des protéines sécrétées de 60-80KDa, très conservées au cours de l'évolution et appartenant au groupe des laminines, protéines principales composantes des membranes basales. Les Nétrines ont inialement été décrites comme des facteurs chimiotropiques indispensables au guidage de certains axones et neurones au cours de la mise en place du système nerveux. Chez l'homme, il existe cinq Nétrines différentes : la Nétrine-1, la Nétrine-3, la Nétrine-4 ainsi que les Nétrines G1 et G2 mais toutes les Nétrines ne sont pas conservées entre les espèces. Ainsi, chez le zebrafish la Nétrine-1a, Nétrine-1b (ces deux dernières présentant plus de 80% d'identités de séquences avec la Nétrine-1 humaine), Nétrine-2 et Nétrine-4 ont été décrites ; mais pas les Nétrines G.

D'un point de vue structural, les Nétrines sont composées de 3 domaines : un peptide signal (extrémité N-Terminale), un domaine d'homologie aux laminines (domaine VI), trois domaines d'homologies à l'EGF (domaines V1, V2 et V3) et un domaine C-Terminal (domaine C), n'ayant pas d'homologie particulière mais apparenté à certains domaines du récepteur Frizzled (récepteur des morphogènes Wnt) (**figure 14**). Les Nétrines G possèdent également en C-terminal un domaine d'ancrage à la membrane nommé : GlucosylPhosphatidylInnositol (GPI).

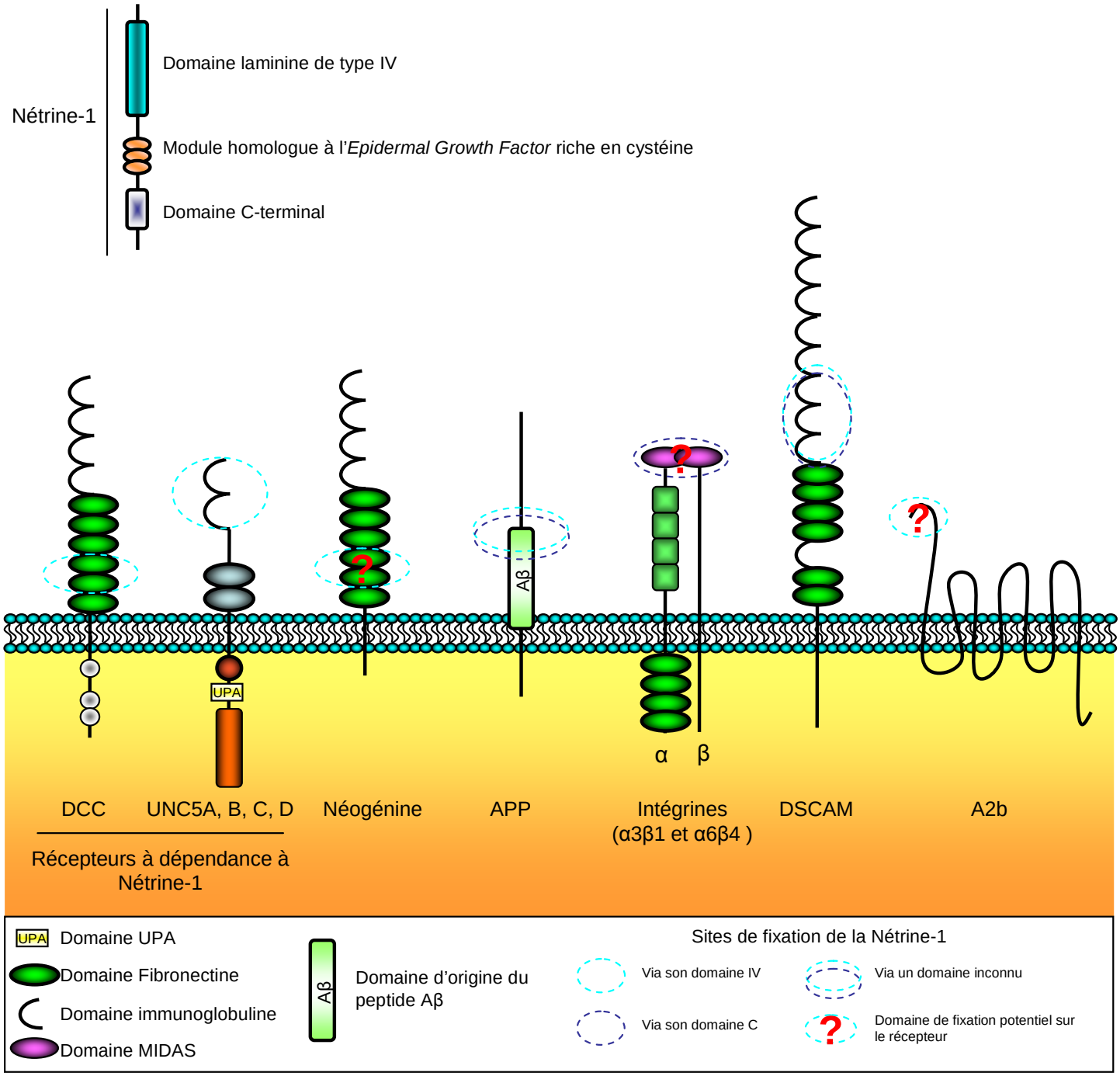


Figure 14 : Structure de la Nétrine-1 et de ses récepteurs

La Nétrine-1 est une protéine appartenant à la famille des laminines capable de fixer le domaine extracellulaire de plusieurs récepteurs via son domaine C-terminal ou son domaine apparenté aux laminines de type IV. Ces 8 récepteurs ont un domaine de fixation à la Nétrine-1 variable : domaine fibronectine 4-5 pour DCC, domaines Ig pour UNC5H, extrémité N-terminale du domaine Aβ (APP) et domaines Ig 7-9 (DSCAM). Les domaines de fixation de Néogénine, des intégrines α3β1 et α6β4 et de A2b indiqués sont hypothétiques.

Le domaine C est le domaine le moins conservé entre les espèces et ne semble pas nécessaire à la fonction propre des Nétrines. Parmi les Nétrines, la Nétrine-1 correspond au ligand des récepteurs à dépendance UNC5H et DCC (appelés récepteurs à dépendance à Nétrine-1 par la suite). La Nétrine-1 est également capable de se lier à d'autres récepteurs sans pour autant induire un état de dépendance vital des cellules. Nous appelerons donc plus simplement ces autres récepteurs : récepteurs à la Nétrine-1. La Nétrine-1 est capable d'interagir avec ses récepteurs via deux domaines : son domaine C et son domaine VI. Alors que son domaine C est riche en acides aminés basiques et capable de lier l'héparine, les héparanes sulfates et les glycolipides, permettant aux Nétrines de fixer différents composants de la matrice extracellulaire de manière aspécifique tels que les intégrines (Keino-Masu et al., 1996; Serafini et al., 1994; Yebra et al., 2003), le domaine VI de la Nétrine-1 de part sa structure globulaire reconnaît spécifiquement des domaines extracellulaires des récepteurs UNC5H, et DCC (**figure 14**).

2. Les récepteurs à dépendance à Nétrine-1

Bien qu'ayant un ligand commun, les récepteurs DCC et UNC5H ont une structure très différente (**figure 14**). La Nétrine-1 est capable de lier la partie extracellulaire de ces deux récepteurs respectivement au niveau de leurs domaines fibronectines 4 et 5, et de leurs deux domaines immunoglobulines (**figure 14**)(Bennett et al., 1997; Geisbrecht et al., 2003; Kruger et al., 2004). En particulier, dans le cas du récepteur DCC, il est à noter qu'il existe une controverse concernant son domaine d'interaction avec la Nétrine-1. En effet, alors que les groupes Leahy et Linsley ont montré notamment par des expériences de *pull-down* que la Nétrine-1 interagissait avec le 5ème domaine fibronectine du récepteur DCC, le groupe Guan a montré par des expériences de co-immunoprécipitations que la Nétrine-1 était capable d'interagir avec le 4ème domaine fibronectine de DCC. Au laboratoire, nous avons réconcilié ces deux études puisque nous avons montré en test ELISA que deux peptides recombinants correspondants respectivement au 4ème domaine fibronectine (DCC-4Fbn) et au 5ème domaine fibronectine (DCC-5Fbn) de DCC étaient tous deux capables d'interagir avec la Nétrine-1. De plus, par des expériences d'immunofluorescence, nous avons mis en évidence que ces deux peptides sont capables de se fixer aux membranes cellulaires où ils colocalisent avec la Nétrine-1 endogène produite par des cellules (lignées tumorales à expression autocrine de Nétrine-1), et l'ajout de Nétrine-1 exogène inhibe cette colocalisation (donnée non-publiée). D'un point de vue plus fonctionnel il a également été montré que ces deux peptides (DCC-4Fbn et DCC-5Fbn) étaient capables d'induire la mort cellulaire de cellules Nétrine-1

dépendantes exprimant les récepteurs UNC5H ou DCC suggérant que ces deux peptides sont capables de titrer la Nétrine-1 et/ou d'inhiber sa fonction anti-apoptotique médiée à la fois par les récepteurs à dépendance UNC5H et DCC. Ainsi, l'ensemble de ces données suggère que la Nétrine-1 est capable d'interagir à la fois avec les domaines fibronectines 4 et 5 du récepteur à dépendance DCC, et que cette interaction est nécessaire à la fonction anti-apoptotique de la Nétrine-1.

Alors que le domaine intracellulaire du récepteur DCC ne contient pas de domaine particulier impliqué dans les processus apoptotiques, le domaine intracellulaire des récepteurs UNC5H comporte : un domaine de mort (DD) et un domaine ZU-5 (*Zona Occludens/Unc5 homology domain*) indispensables à sa fonction pro-apoptotique (**figure 14**). En effet, la délétion de ces deux domaines sur les récepteurs UNC5H est associée à une perte de leur pouvoir pro-apoptotique lorsqu'ils sont surexprimés dans des cellules en culture (Llambi et al., 2001; Williams et al., 2003a). Outre ces deux domaines, les récepteurs UNC5H sont également constitués d'un domaine de liaison à DCC (DB pour *DCC Binding*) également appelé UPA car conservé entre les protéines UNC5H, PIDD et les Ankyrines. Ce dernier domaine n'est pas indispensable au pouvoir pro-apoptotique des récepteurs UNC5H car les protéines UNC5H2-WT et UNC5H2ΔUPA induisent la mort cellulaire de manière similaire sur des cellules en culture. Toutefois, il semble que la conformation du domaine UPA soit capable de stimuler ou bien d'inhiber le pouvoir pro-apoptotique du récepteur UNC5H2 en modulant la conformation entière du domaine intracellulaire (cf **figure 13**)(Wang et al., 2009a).

3. Les autres récepteurs à la Nétrine-1

La Nétrine-1 est également capable de se fixer sur d'autres récepteurs transmembranaires tels que Néogénine, les intégrines $\alpha_3\beta_1$ et $\alpha_6\beta_4$, APP, DSCAM (*Down Syndrome Cell Adhesion Molecule*) ou encore A2b (Corset et al., 2000; Liu et al., 2009; Lourenco et al., 2009; Ly et al., 2008; Srinivasan et al., 2003; Yebra et al., 2003). Bien que le domaine d'interaction de Néogénine, d'A2b et des intégrines avec la Nétrine-1 n'ait pour l'instant pas été identifié, la forte homologie structurale de Néogénine et DCC ainsi que la structure du domaine extracellulaire des intégrines $\alpha_3\beta_1$ et $\alpha_6\beta_4$ suggère que ceux sont leurs domaines fibronectines 4-5 et leurs domaines MIDAS respectifs qui sont responsables de la liaison de la Nétrine-1 (**figure 14**). Le récepteur APP lie la Nétrine-1 au niveau de la partie N-terminale du domaine Aβ et le récepteur DSCAM au niveau de ses domaines immunoglobulines 7,8,9 (**figure 14**) (Liu et al., 2009; Lourenco et al., 2009; Ly et al., 2008).

Ces récepteurs n'ont pas été caractérisés comme des récepteurs à dépendance à Nétrine-1 mais modulent l'action de la Nétrine-1 dans divers processus physiologiques tels que la survie cellulaire, le guidage axonal et la morphogenèse de certains organes que je détaillerai dans la partie IV de ce chapitre.

B. Signalisation positive des récepteurs DCC et UNC5H en présence de Nétrine-1

En présence de Nétrine, les récepteurs UNC5H et DCC activent trois types de voies de signalisation faisant intervenir (i) de nombreuses protéines kinases, (ii) certaines RhoGTPases ou (iii) permettant de moduler la concentration cytosolique de calcium. Ces voies stimuleraient ainsi la prolifération et la survie cellulaire et permettraient également de remodeler le cytosquelette, élément essentiel à l'une des fonctions majeures des récepteurs UNC5H et DCC : le guidage axonal consistant en la projection et à l'orientation d'axones à partir de corps cellulaires neuronaux (voir paragraphe IV page 48)(Mehlen and Furne, 2005).

1. Voie des protéines kinases

En présence de Nétrine-1, les récepteurs UNC5H et DCC sont présents dans les membranes des cellules à l'état d'oligomères, localisés dans les rafts dans le cas du récepteur DCC. Sous cette forme, les récepteurs UNC5H et DCC sont phosphorylés via l'intervention des protéines kinases FAK, Fyn et la famille Src (Li et al., 2006b; Ren et al., 2008). Sous leur forme phosphorylés, les récepteurs DCC et UNC5H vont activer des protéines kinases effectrices : PI(3)K, Akt et ERK1/2 (Forcet et al., 2002; Nguyen and Cai, 2006; Tang et al., 2008). Il est à noter que dans le cas du récepteur UNC5H2 l'activation de cette deuxième série de protéine kinase se fait via l'intervention de la protéine adaptatrice à activité GTPase PIKE-L interagissant avec le domaine intracellulaire du récepteur UNC5H et son domaine de mort (**figure 15**)(Tang et al., 2008).

Les kinases effectrices stimulent la prolifération et la survie cellulaire via les mécanismes évoqués précédemment (voir chapitre 1, IV.D p20) mais aussi par des mécanismes indépendants. En effet, il a été montré que la Nétrine-1 était capable d'induire spécifiquement via la voie ERK1/2, l'activation du facteur de transcription Elk1 (Forcet et al., 2002). Dans les mêmes conditions, DCC est capable via la voie ERK d'induire l'activation du facteur de transcription NFAT (**figure 15**)(Graef et al., 2003). Les cibles de ces deux régulateurs transcriptionnels sont nombreuses et comprennent : des facteurs impliqués dans la migration et la prolifération cellulaire tels que cyclooxygénase 2 (COX2) et l'autotaxine qui

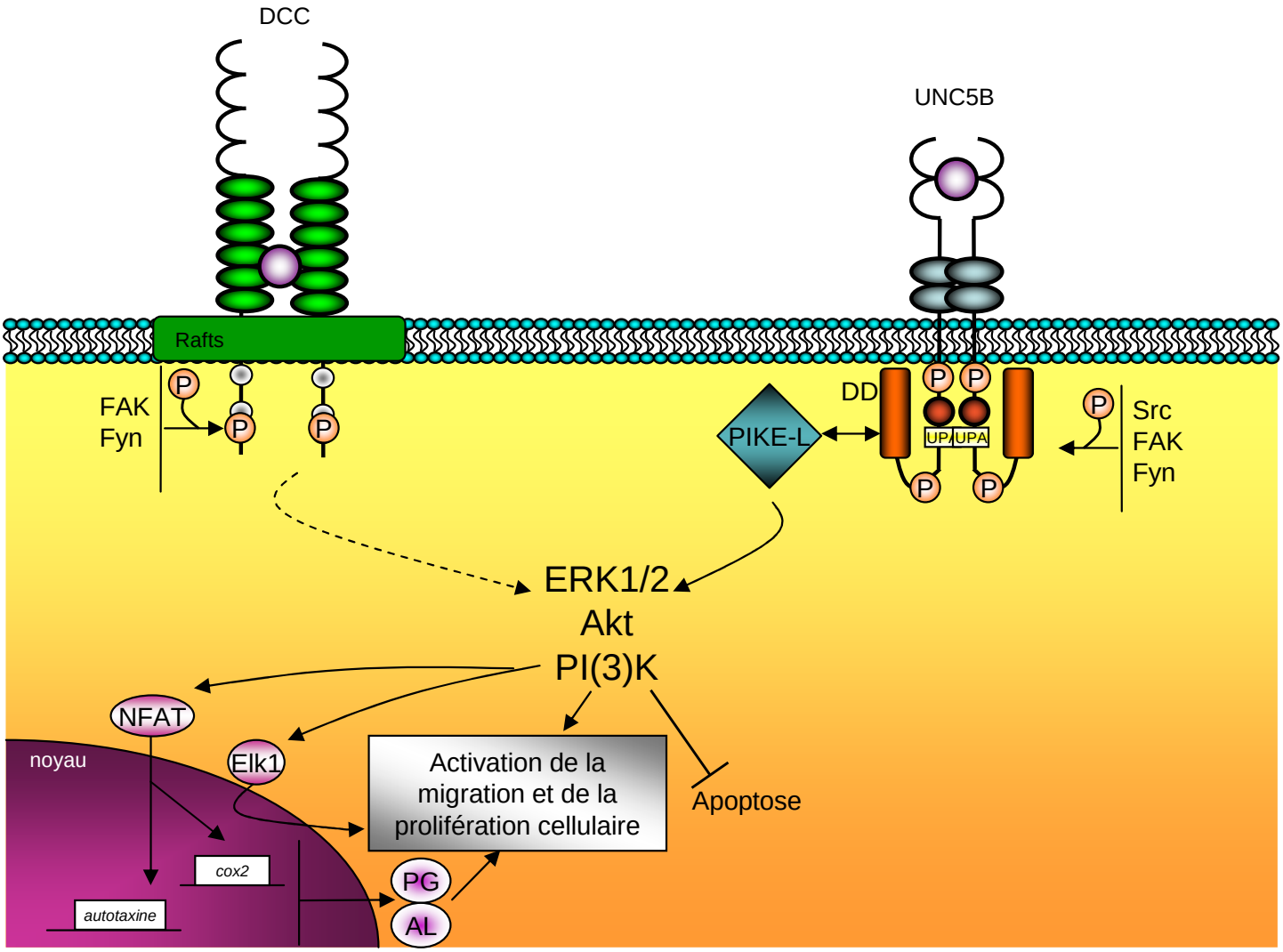


Figure 15: Signalisation positive des récepteurs DCC et UNC5H en présence de Nétrine : voie des protéines kinases

La Nétrine-1 stimule l'activation des protéines kinases Src, Fyn et FAK qui vont en retour phosphorylés le domaine intracellulaire des oligomères des récepteurs DCC et UNC5H. Sous cette forme, les récepteurs UNC5H recrutent la protéine GTPase PIKE-L à l'origine de l'activation des kinases effectrices ERK1/2, Akt et PI(3)K. DCC est également capable d'activer ces protéines kinases qui vont activer la migration et la prolifération cellulaire et inhiber l'apoptose. En particulier, ERK1/2 active les facteurs de transcription NFAT et Elk1 conduisant à la formation de prostaglandines (PG) et d'acide lysophosphatidique (AL) qui vont contribuer à la migration et à la prolifération cellulaire.

permettent la formation de prostaglandines (PG) et d'acide lysophosphatidique (AL) (Mancini and Toker, 2009). Toutefois, l'implication de ces protéines dans la fonction physiologique des récepteurs DCC et UNC5H reste à démontrer.

2. Voie d'activation des RhoGTPases

Les récepteurs UNC5H1 et DCC sont également capable d'activer les RhoGTPases Rac1 (*Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*), RhoA et Cdc42 (*Cell division cycle 42*) de manière tissus-dépendante (Li et al., 2002; Picard et al., 2009; Rajasekharan et al., 2009; Shekarabi et al., 2005). Les RhoGTPases fonctionnent généralement au sein de complexes intégrant des facteurs d'échange de nucléotide guanine (GEF) qui portent du GTP (forme active des RhoGTPases) ou du GDP (forme inactive), et participent au remodelage cytosquelettique au cours du guidage axonal.

L'activation de Cdc42 et Rac1 par DCC implique le recrutement de la protéine adaptatrice Nck-1. Cette interaction est indépendante de la présence de Nétrine-1 car cette dernière n'influence pas l'interaction Nck-1/DCC observée *in vitro* sur des cellules COS7 transfectées et *in vivo* sur des cultures primaires de neurones commissuraux spinaux (Li et al., 2002). Toutefois, il a été montré que l'activation de Cdc42 et Rac1 était aussi contrôlée par les protéines kinases Src et p130cas elles-mêmes activées uniquement en présence de Nétrine-1, suggérant que cette dernière à un rôle essentiel dans l'activation de ces RhoGTPases (Liu et al., 2007). Il a également été montré que l'activation de Rac1 nécessitait la protéine GEF Trio. En effet, la délétion de cette dernière bloque l'activation de Rac-1 normalement induite par le couple DCC/Nétrine-1. Trio se localise au sein d'un complexe comprenant Nck-1 et DCC mais son site d'interaction avec Nck-1 et/ou DCC reste à identifier (**figure 16**)(Briancon-Marjollet et al., 2008). Les RhoGTPases Cdc42 et Rac1 ainsi activées recrutent et activent N-WASP (Neuronal Wiskott–Aldrich Syndrome Protein) et PAK1 (P21 Activated Kinase) induisant un remodelage du cytosquelette (notamment d'actine) et participant ainsi à la migration cellulaire et au guidage axonal (**figure 16**). DCC est également capable d'induire l'inactivation de la RhoGTPase RhoA via l'intervention de Fyn et de FAK en présence de Nétrine-1 stimulant ainsi la différenciation des oligodendrocytes via des cibles inconnues (Rajasekharan et al., 2009).

UNC5H1 est également capable d'induire l'activation de Rac1, Cdc42 et RhoA en présence de Nétrine-1 dans des fibroblastes. Plus spécifiquement, l'activation de Rac1 a également été observée sur des cellules de neuroblastomes N1E-115 après traitement à la Nétrine-1 ayant pour conséquence l'induction de l'expansion de neurites via un phénomène

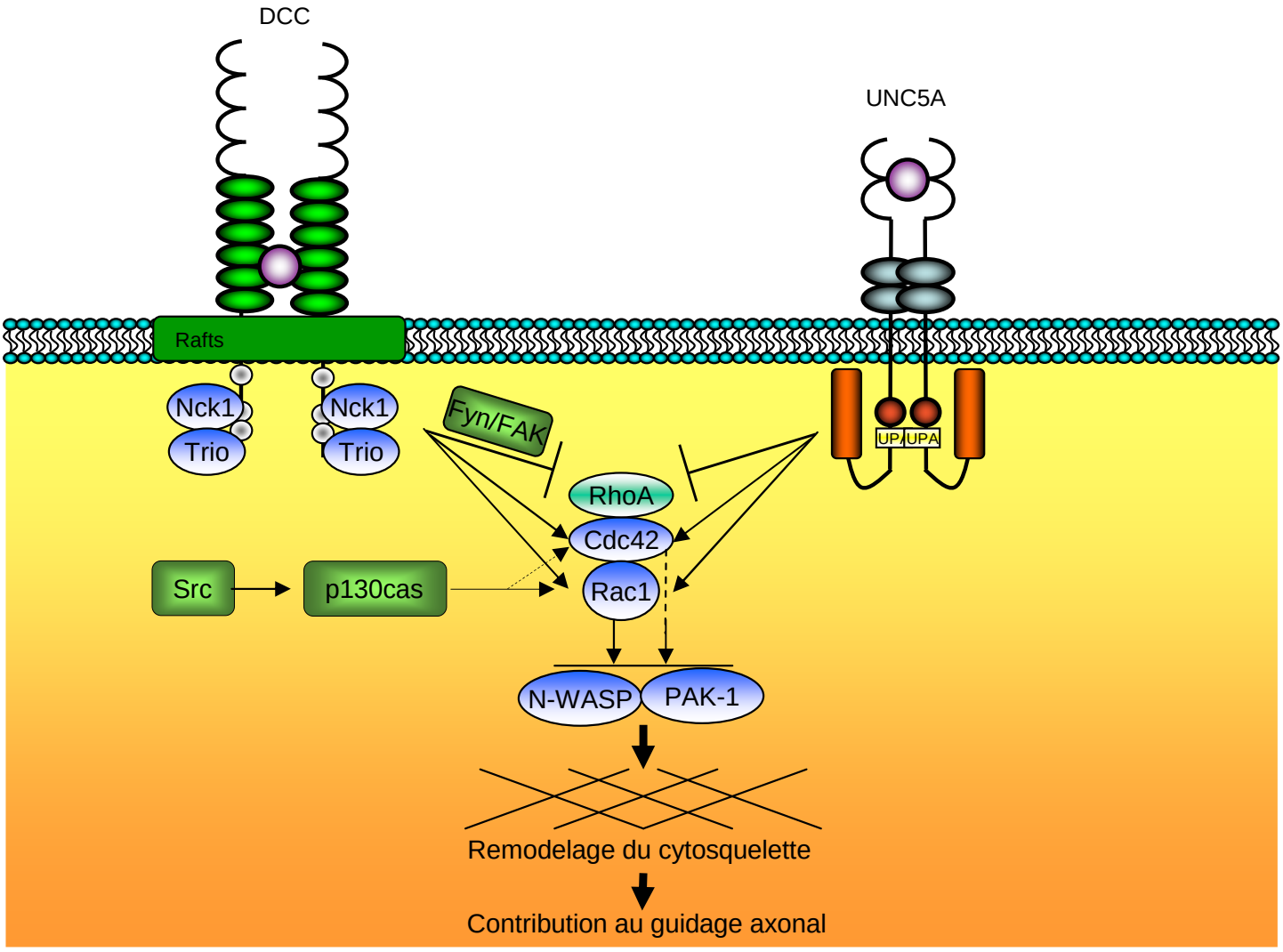


Figure 16: Signalisation positive des récepteurs DCC et UNC5H en présence de Nétrine : voie des RhoGTPases. En présence de Nétrine-1, le récepteur DCC recrute la protéine adaptatrices Nck-1, la protéine GEF Trio et active ainsi les RhoGTPases Cdc42 et Rac1. UNC5A est également capable d'activer Cdc42 et Rac1 mais le mécanisme qui en est à l'origine n'est pas connu. L'activation de Cdc42 et Rac1 est également renforcée par l'intervention des protéines kinases Src et P130cas. Enfin, Cdc42 et Rac1 activés activent à leur tour N-WASP et la protéine kinase PAK-1. A l'inverse, DCC via l'activation des protéines kinases Fyn et FAK ; ainsi que le récepteur UNC5A inhibent RhoA en présence de Nétrine-1. L'ensemble de ces évènements médiés par les RhoGTPases conduit au remodelage du cytosquelette participant au guidage axonal.

UNC5H1 dépendant. Ainsi, l'activation de Rac1 par la Nétrine-1 pourrait être également impliquée dans le guidage axonal (**figure 16**). Dans cette étude, il a également été montré que le récepteur UNC5H1 délété de son domaine intracellulaire (UNC5H1ΔIC) active également Rac1 en présence de Nétrine-1. Une hypothèse pour expliquer ce résultat est la formation d'hétérodimères entre le récepteur UNC5H1ΔIC avec le récepteur UNC5H1 endogène qui pourrait transactivés Rac1 (Picard et al., 2009). L'ensemble des éléments de cette étude suggère qu'en présence de Nétrine-1, UNC5H1 est capable d'activer Cdc42, Rac1 et/ou RhoA en fonction du type cellulaire *in vitro* mais reste à confirmer *in vivo*.

3. Modulation du taux de calcium cytosolique

En présence de Nétrine-1, DCC et les récepteurs UNC5H sont également capables de moduler le taux de calcium, d'AMPc et de GMPc (Adénosine et Guanosine MonoPhosphate cyclique) dans le cytosol (Nishiyama et al., 2003). En effet, il a été montré sur des neurones spinaux de xénope que le récepteur DCC (endogène) est capable –via un mécanisme inconnu- d'activer l'ouverture des canaux calciques présents dans la membrane plasmique et dans la membrane du reticulum endoplasmique induisant ainsi un relargage de Ca2+ dans le cytosol (**figure 17**). En présence de Nétrine-1, DCC est également capable d'induire une augmentation de la concentration cytosolique d'AMPc. Cette hausse pourrait être liée à l'intervention d'un autre récepteur à la Nétrine-1 : A2b. En effet, ce récepteur appartient à la famille des récepteurs spécifiques de l'adénosine et est capable d'activer directement d'Adenylate Cyclase, enzyme responsable de la synthèse d'AMPc. De plus, A2b interagit avec DCC en présence de Nétrine-1 ce qui renforce l'idée d'une collaboration entre DCC et A2b pour la production d'AMPc (**figure 17**)(Corset et al., 2000). L'AMPc activerait la protéine kinase A (PKA également appelée *c-AMP-dependent protein kinase*), elle-même capable d'activer l'ouverture des canaux calcique amplifiant ainsi le relargage cytosolique du calcium. A l'inverse, lorsque le récepteur UNC5H2 est surexprimé dans ce type de neurone, aucune augmentation du calcium ou d'AMPc cytosolique n'est observée. En effet, il a été montré que l'expression du dimère UNC5H2/DCC –récepteurs intéragissant via leur domaine UPA- induit une hausse de la concentration du GMPc cytosolique qui serait à l'origine de la fermeture des canaux calciques via l'activation de la protéine kinase G (PKG également appelée *c-GMP dependent protein kinase*) (**figure 17**). La modulation de la concentration calcique cytosolique par les récepteurs DCC ou DCC/UNC5H2 en présence de Nétrine-1 régulerait l'activité de nombreuses protéines cytosoliques calcium-dépendante telles que la calmoduline et la calcineurine qui régulent l'activation du facteur de transcription NFAT et

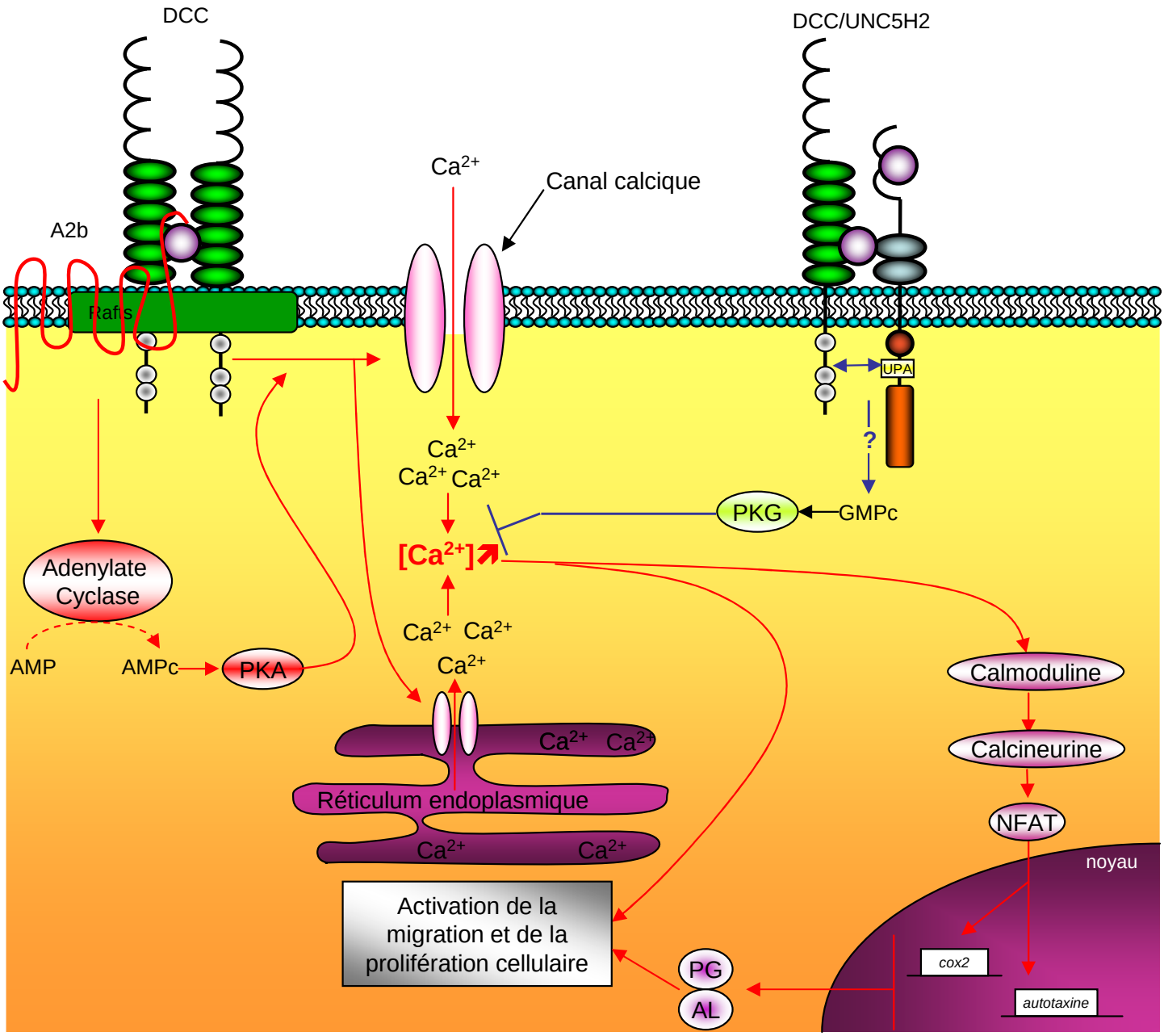


Figure 17: Signalisation positive des récepteurs DCC et UNC5H en présence de Nétrine : voie du calcium

En présence de Nétrine-1, le récepteur DCC est capable d'interagir avec A2b et d'induire ainsi un influx calcique cytoplasmique via notamment l'activation de la PKA et la production d'AMPc. A l'inverse, le récepteur DCC lorsqu'il interagit avec le récepteur UNCH induit une augmentation du GMPc cytoplasmique et une inhibition de l'influx calcique. Cette modulation de la concentration en calcium contrôle l'activation de la migration et de la prolifération cellulaire.

ainsi l'activation de gènes impliqués dans la prolifération et la migration cellulaire (cf § précédent). Parmi les protéines calcium-dépendante, les calpaïnes pourraient également être activées par l'influx calcique et participer au remodelage cytosquelettique nécessaire au guidage des axones exprimant DCC et UNC5H2 (**figure 17**) (Suzuki et al., 2004). Il existe probablement d'autres mécanismes calcium-dépendant impliqués dans la signalisation positive de DCC et des récepteurs UNC5H mais ces derniers restent à identifier.

C. Signalisation pro-apoptotique des récepteurs DCC et UNC5H en absence de Nétrine-1

Comme nous l'avons vu précédemment, les récepteurs DCC et UNC5H, en absence de Nétrine-1, sont transloqués dans les rafts sous une forme monomérique (Furne et al., 2006; Maisse et al., 2008; Mille F, 2009) où ils sont respectivement clivés par des protéases (la caspase 3 *in vitro*) en D1290 (DCC) et D412 (UNC5H).

1. Signalisation pro-apoptotique du récepteur DCC

Le domaine ADD de DCC ainsi exposé, recrute la protéine DIP13α/APPL (*DCC Interacting Protein 13α/Adapter protein containing PH domain, PTB domain, and Leucine zipper motif*) et est à l'origine de l'activation de la caspase 9 par un mécanisme mal connu. Une hypothèse est que la protéine DIP13α/APPL, la pro-caspase 9 et le domaine ADD de DCC, forment un complexe sous-membranaire responsable de l'activation locale de la caspase 9. De plus, il a été montré que DIP13α/APPL était un inhibiteur de la protéine kinase anti-apoptotique Akt (inhibitrice de la caspase 9). La caspase 9 ainsi activée, activerait alors massivement la caspase 3 aboutissant d'une part à une amplification du signal apoptotique par clivage d'autres récepteurs DCC, et d'autre part à l'induction de l'apoptose (**figure 18**)(Liu et al., 2002; Mehlen et al., 1998).

2. Signalisation pro-apoptotique des récepteurs UNC5H

Le domaine ADD des récepteurs UNC5H correspond à son domaine intracellulaire et comporte deux domaines essentiels : le ZU-5 et le Death Domain. En effet, des études *in vitro* montrent que le domaine ADD d'UNC5H1 permet le recrutement via son domaine ZU-5 de la protéine pro-apoptotique NRAGE (*Neurotrophin Receptor-interacting melanoma AntiGEn*) alors que le domaine de mort du récepteur UNC5H2 permet le recrutement de la DAPk (*Death Associated Protein Kinase*). NRAGE et la DAPk vont induire l'activation de la voie

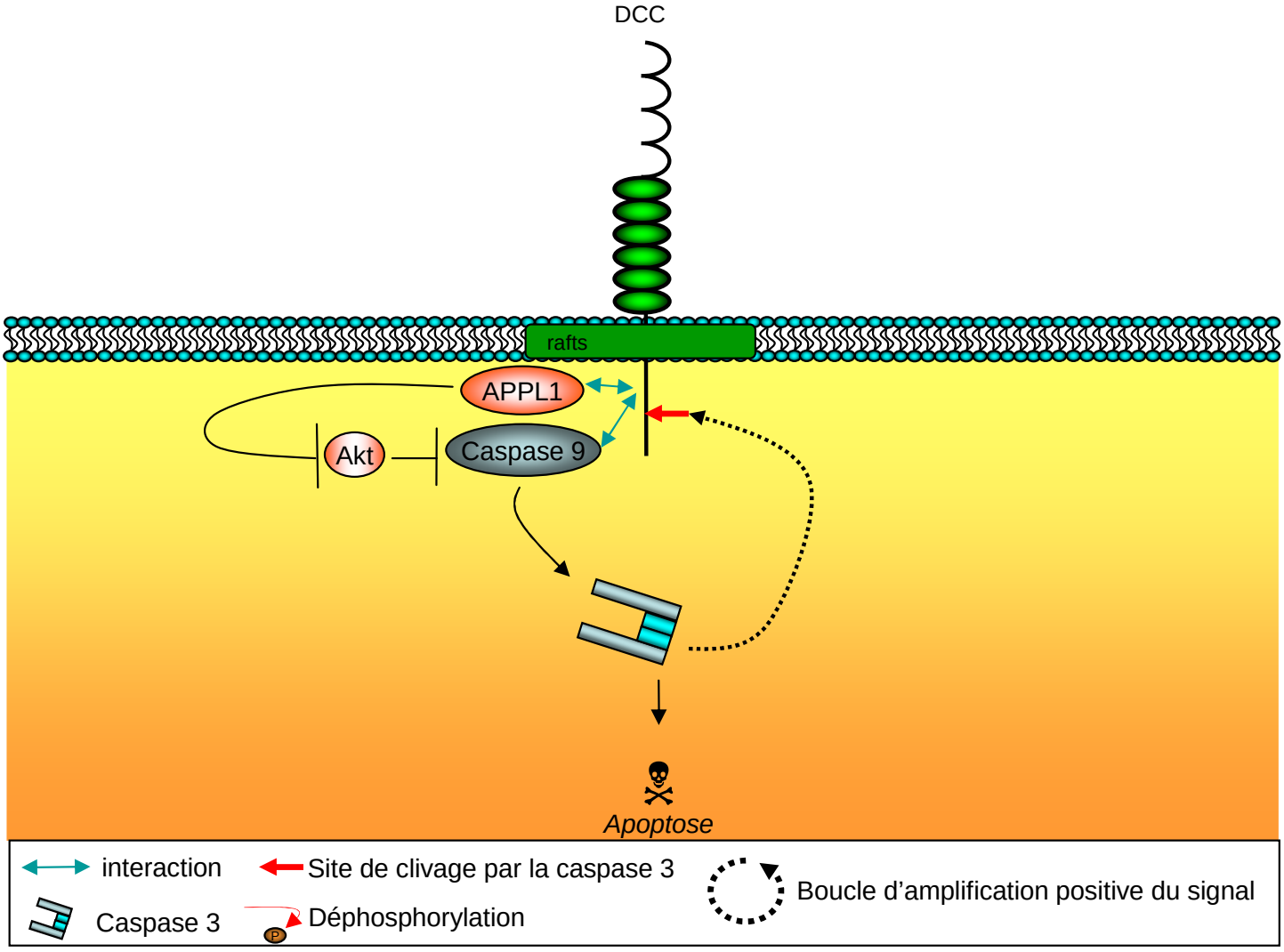


Figure 18 : Signalisation pro-apoptotique du récepteur à dépendance DCC en absence de Nétrine-1. En absence de Nétrine-1, DCC se relocalise dans les rafts et est clivé par la caspase 3. Ce clivage permet le recrutement de la protéine APPL1 et de la caspase 9. La caspase 9 est activée localement et active à son tour la caspase 3 induisant d'une part l'apoptose et d'autre part une boucle d'amplification positive du signal. **B. Signalisation pro-apoptotique induite par les récepteurs UNC5A et UNC5B**. En absence de Nétrine-1, ces deux récepteurs sont transloqués dans les rafts et clivés. Les fragments de clivage d'UNC5A et UNC5B recrutent respectivement via leur domaine ZU-5 et leur domaine de mort la protéine NRAGE et la DAPKinase. NRAGE active la voie JNK et inhibe la protéine XIAP et le facteur de transcription che-1 conduisant ainsi à l'activation de la caspase 3 via. Cette activation pourrait être dépendante de l'apoptosome, mais cela reste à démontrer. La DAPkinase active également la voie JNK et active ainsi la caspase 3. La caspase 3 activée par ces deux mécanismes UNC5A et UNC5B-spécifiques va induire l'apoptose et amplifier le signal apoptotique. La DAPK est également capable de déstabiliser le cytosquelette participant ainsi plus directement au processus apoptotique.

JNK mais aussi par des mécanismes indépendants (Eisenberg-Lerner and Kimchi, 2007; Salehi et al., 2002)

NRAGE –identifiée comme interacteur d'UNC5H1 par crible double hybride- est une protéine cytoplasmique comportant un domaine d'homologie de type MAGE (*Melanoma AntiGEn*) et est capable d'induire l'apoptose via deux mécanismes : la séquestration et l'inhibition de protéines anti-apoptotiques telles que XIAP ou le facteur de transcription che-1 (Di Certo et al., 2007; Jordan et al., 2001) ; et l'activation des voies MAPK JNK et p38MAPK (**figure 19**)(Kendall et al., 2005; Salehi et al., 2002). Enfin, il a récemment été montré que NRAGE est capable via l'activation de la voie JNK, d'induire la formation de l'apoptosome et ainsi de renforcer l'activation de la caspase 9 (Salehi et al., 2002).

En parallèle, il a été montré que le domaine de mort d'UNC5H2 et de la DAPk sont fortement homologues et interagissent (Llambi et al., 2005; Williams et al., 2003a). La DAPk correspond à une protéine kinase sous membranaire à fonction pro-apoptotique (en particulier dans la réponse au stress du réticulum endoplasmique ou dans la voie induite par les céramides) capable d'interagir avec le cytosquelette et dont l'activité est modulée par le calcium via un site de liaison à la calmoduline (non-représenté sur la figure) et via l'auto-phosphorylation de la sérine 308. En absence de stimulus apoptotique, la sérine-thréonine kinase DAPk est présente à l'état phosphorylé (Ser308) et inactif dans le cytosol (Shohat et al., 2002a; Shohat et al., 2002b). Sous cette forme, elle est capable d'interagir via son domaine de mort avec le domaine intracellulaire du récepteur UNC5H2. En absence de Nétrine-1, la surexpression du récepteur UNC5H2 est à l'origine de l'activation de la DAPk suite à sa déphosphorylation et à l'induction de l'apoptose (Llambi et al., 2005; Wang et al., 2009a). Cette activation par déphosphorylation implique une phosphatase et est indispensable à l'induction de l'apoptose par UNC5H2 (**figure 19**). En effet, il a été montré qu'un inhibiteur de l'activité phosphatase des complexes PP2A et PP1 (l'acide okadaïque) bloque *in vitro* la déphosphorylation de la DAPk (Gozuacik et al., 2008). D'autre part, la cotransfection d'un mutant constitutivement inactif de la DAPk (DAPk-K42A) inhibe la mort induire par la surexpression du récepteur UNC5H2 dans des cellules HEK293T (Llambi et al., 2005).

La DAPk activée est capable d'induire l'apoptose indépendamment de la voie JNK via deux mécanismes distincts : l'inhibition de ERK et l'induction de p53 (**figure 19**). La DAPk est capable d'induire par un mécanisme inconnu la séquestration cytosolique de ERK l'empêchant ainsi d'agir sur ses cibles, mais aussi d'induire p53. En effet, il a été montré sur des fibroblastes embryonnaires de souris que la suppression de la DAPk par recombinaison homologue entraînait une diminution de l'activité de p53 et de son régulateur $p19^{ARF}$

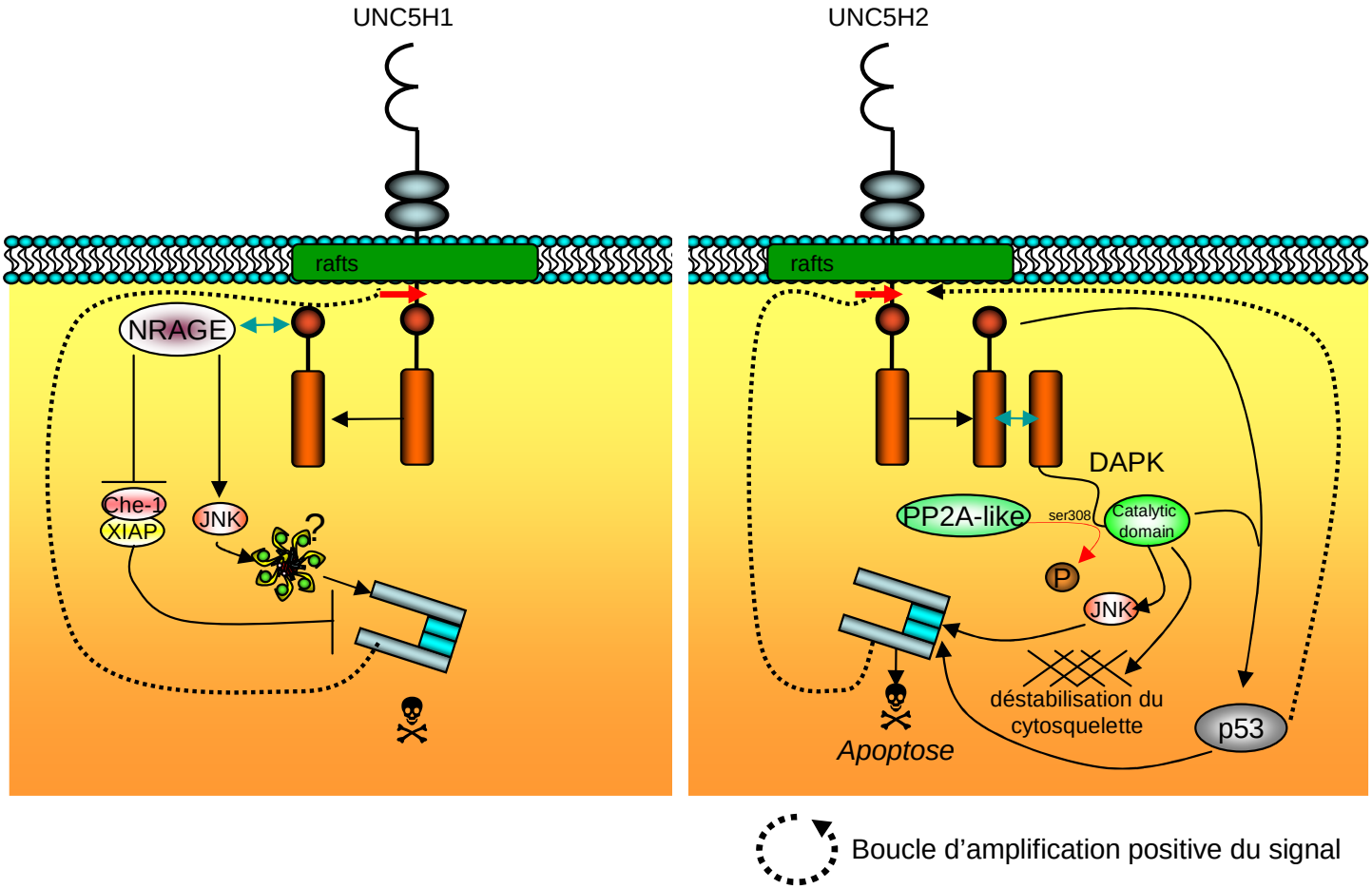


Figure 19 : Signalisation pro-apoptotique des récepteurs à dépendance UNC5H1 et UNC5H2 en absence de Nétrine-1. En absence de Nétrine-1, ces deux récepteurs sont transloqués dans les rafts et clivés. Les fragments de clivage d'UNCA et UNC5B recrutent respectivement via leur domaine ZU-5 et leur domaine de mort la protéine NRAGE et la DAPKinase. NRAGE active la voie JNK et inhibe la protéine XIAP et le facteur de transcription che-1 conduisant ainsi à l'activation de la caspase 3 via. Cette activation pourrait être dépendante de l'apoptosome, mais cela reste à démontrer. La DAPkinase active également la voie JNK et active ainsi la caspase 3. La caspase 3 activée par ces deux mécanismes UNC5A et UNC5B-spécifiques va induire l'apoptose et amplifier le signal apoptotique. UNC5B est également capable d'induire l'apoptose via l'activation de p53 par un mécanisme DAPk dépendant ou non. Enfin, la DAPK est également capable de déstabiliser le cytosquelette participant ainsi plus directement au processus apoptotique.

conduisant ainsi à une réduction de l'apoptose. Au contraire, la surexpression de la DAPk dans ce même type cellulaire induit une stabilisation de p53 via un mécanisme dépendant de $p19^{ARF}$ (Raveh et al., 2001). La DAPk participerait également à la finalisation de l'apoptose en déstabilisant grâce à son activité kinase certaines protéines cytosquelettiques telles que les tubulines et les myosines (**figure 19**) (Eisenberg-Lerner and Kimchi, 2007; Shohat et al., 2002a).

Enfin, il est à noter qu'une autre étude révèle que le récepteur UNC5H2 est également capable d'induire une activation directe de l'apoptose médiée par p53 *a priori* indépendamment de la DAPk. Dans cette étude, il est également suggéré que le gène unc5h2 est une cible transcriptionnelle de p53 ce qui aboutirait à la mise en place d'une boucle d'amplification positive du signal (**figure 19**)(Tanikawa et al., 2003).

D. Régulation de la signalisation induite par UNC5H et DCC

1. Régulation de leur fonction par phosphorylation et localisation

Comme nous l'avons vu précédemment (voir II.B p36), le type de signalisation médié par les récepteurs à dépendance DCC et UNC5H est directement lié à la présence ou non de Nétrine-1 qui va induire des modifications de leur état de phosphorylation, de leur localisation membranaire (rafts) et de leur conformation tridimensionnelle ; ces trois conditions vont être responsables du recrutement de partenaires pro- ou anti-apoptotiques et ainsi de l'induction ou non de l'apoptose.

2. Régulation de l'expression des protéines DCC, UNC5H et Nétrine-1

Au cours du développement embryonnaire, la Nétrine-1 et ses récepteurs DCC et UNC5H3 sont exprimés principalement dans le système nerveux. Au contraire, chez l'adulte, l'expression de ces récepteurs et de leur ligand est ubiquitaire. Un déséquilibre du ratio ligand/récepteur pouvant conduire à une mort cellulaire massive ou au contraire à une survie cellulaire anormale, cette expression ubiquitaire des protéines DCC, UNC5H et Nétrine-1 suggère une étroite régulation.

Au niveau transcriptionnel, les facteurs de transcription p53, HIF-1 (*Hypoxia Inducible Factor 1*) et NFκB ont été identifiés comme des activateurs de l'expression des gènes *unc5h4*, la *nétrine-1* et du *gène unc5h2* (cf paragraphe III, C, 2 p 45). En effet, il a été montré d'une part que l'activation de p53 par des dommages à l'ADN était associée à une augmentation de la transcription d'*unc5h4*, et d'autre part que l'induction de NFκB par le

TNF ou de HIF-1 par l'hypoxie dans un contexte inflammatoire, activaient la transcription de la *nétrine-1* (Paradisi et al., 2008; Rosenberger et al., 2009; Wang et al., 2008). Cette activation transcriptionnelle est vraisemblablement directe car des éléments de réponse à p53 et NFκB ont été identifiés dans les régions promotrices des gènes *unc5h4* et *nétrine-1* (Paradisi et al., 2008; Wang et al., 2008). De manière intéressante, on peut remarquer que l'expression des récepteurs à dépendance DCC et UNC5H et leur ligand est sous le contrôle de facteurs de transcription induits dans des contextes bien particulier : les dommages à l'ADN (p53) ou encore l'inflammation (NFκB, HIF-1) qui rappellent les contextes d'activation des récepteurs de mort. Ainsi, il est possible que les récepteurs à dépendance soient capables de collaborer avec les récepteurs de mort pour induire l'apoptose dans les types cellulaires où les deux voies co-existent.

Une régulation post-transcriptionnelle du récepteur UNC5H1 a également été identifiée. En effet, il a été montré sur des cultures primaires de neurones hippocampaux que ce récepteur pouvait être internalisé dans le cytosol suite à l'activation d'un complexe comprenant la protéine kinase C et la protéine PICK1 (*Protein Interating with C kinase*). Cette internalisation conduit à une inactivation du récepteur UNC5H1 et pourrait donc moduler sa fonction (Williams et al., 2003b). Le signal responsable de l'activation de la PKC n'est pas clairement identifié *in vivo* mais il est transduit par le récepteur A2b. En effet, il a été montré que l'activation d'A2b soit par la fixation d'AMP cyclique, soit par la fixation de la Nétrine-1 était à l'origine de l'activation de la PKC et avait pour conséquence l'internalisation d'UNC5H1 (McKenna et al., 2008).

IV. Rôle physiologique des récepteurs UNC5H, DCC et de leur ligand la Nétrine-1 au cours du développement du système nerveux et vasculaire

Initialement les récepteurs UNC5H, DCC et leur ligand la Nétrine-1 ont été identifiés comme des protéines essentielles au développement du système nerveux chez *Caenorhabditis elegans*. Dans ce modèle, il a été observé que la mutation des protéines Unc5 (homologue des récepteurs UNC5H), Unc40 (homologue du récepteur DCC) et Unc6 (homologue de la Nétrine-1) entraîne l'apparition d'un phénotype "Uncoordinated"(Chan et al., 1996; Hedgecock et al., 1990). Ce phénotype est associé à des problèmes de guidage axonal et de migration cellulaire au cours du développement du nématode. En effet, la croissance des axones des motoneurones, la formation du canal excréteur, et la migration des cellules des gonades sont particulièrement affectées (Chan et al., 1996; Hedgecock et al., 1990).

Comme nous allons le voir chez les vertébrés, le rôle de la Nétrine-1 dans le développement du système nerveux est conservé mais elle l'est également dans l'angiogenèse et la morphogenèse de certains organes.

A. Rôle de la Nétrine-1 et de ses récepteurs dans le développement et le maintien du système nerveux :

Dans le système nerveux, la Nétrine-1 joue le rôle de facteur de survie et de guidage neuronal et son action est essentiellement médiée par les récepteurs à dépendance UNC5H et DCC via leur fontion pro- et anti-apoptotique. Les autres récepteurs à la Nétrine-1 (DSCAM, Néogénine, et les intégrines $\alpha_3\beta_1$) interviennent également –à titre plus accessoire- dans le guidage de certains types de neurones.

1. Rôle des récepteurs à dépendance DCC et UNC5H et de la Nétrine-1 dans le guidage axonal et la survie neuronale.

Le système nerveux est l'une des structures la plus précocément et la plus massivement affectée par l'apoptose au cours du développement. En effet, on estime que la moitié des neurones produits au cours de développement meurent avant ou peu après la naissance ; phénomène indispensable à la mise en place d'un réseau axonal fonctionnel par l'élimination des neurones surnuméraires ou ayant émis des projections axonales aberrantes. D'après la thérorie neurotrophique, les neurones ont besoin pour survivre d'un support trophique fournit par un tissu cible (les facteurs et tissus étant variables en fonction du type neuronal). Les neurones n'atteignant pas cette cible sont éliminés par apoptose. Le mécanisme à l'origine de cette mort est encore mal compris, et la principale explication est que l'interruption des signalisations induites par les facteurs trophiques (notamment les membres de la famille du NGF) induit ces signaux apoptotiques. Par exemple, le NGF stimule via son récepteur TrkA, diverses protéines kinases anti-apoptotiques telles que les MAPK et Akt évoquées précedemment. Chez la souris, l'invalidation du NGF ou de TrkA conduit à une réduction de 70% de la population des neurones sensoriels liée à une apoptose massive des précurseurs de ces neurones qui semble être la conséquence d'une absence de signal de survie que l'on peut qualifier de « mort par défaut » (Ernfors et al., 1994a; Ernfors et al., 1994b).

Comme le NGF, la Nétrine-1 joue le rôle de facteur de survie pour certains types de neurones et a également été impliquée dans des phénomènes de guidage axonal. Chez les mammifères, la fonction de la Nétrine-1 et de ses récepteurs recoupe le phénotype

« *Uncoordinated* » observé chez C. elegans. En effet, il a été montré que les souris déficientes pour la Nétrine-1 présentent de nombreux problèmes développementaux principalement dûs à des défauts de guidage axonal et de mort cellulaire qui conduisent à la mort des souris quelques jours après leur naissance (Bloch-Gallego et al., 1999; Fazeli et al., 1997; Serafini et al., 1996). Les neurones commissuraux c'est-à-dire les neurones ayant la capacité de traverser la ligne médiane du tube neural pour permettre ensuite chez l'adulte la communication entre la partie droite et la partie gauche du cerveau et de la moëlle épinière, sont les plus affectés. La projection axonale de ces neurones est normalement guidée (entre E12 et E15 chez la souris) grâce à des facteurs chimioattractifs et chimiorépulsifs produits par la plaque du plancher (source de Nétrine-1) et la notochorde. Les souris Nétrine-1$^{-/-}$ tout comme les souris DCC$^{-/-}$ présentent une réduction du nombre de neurones commissuraux ainsi qu'un défaut de projection axonale de ces derniers suggérant le rôle conjoint de DCC et de la Nétrine-1 dans la survie et dans le guidage axonal de ces neurones (**figure 20A**)(Bloch-Gallego et al., 1999; Fazeli et al., 1997). Ces résultats ont été confirmés *in vitro* puiqu'il a été montré que la Nétrine-1 était un facteur de survie et un facteur chimioattractif pour les neurones commissuraux exprimant DCC issus de la moëlle épinière (Furne et al., 2008; Keino-Masu et al., 1996). Au contraire, les neurones n'exprimant pas DCC survivent malgré l'absence de Nétrine-1 indiquant que sur ce type de neurone, la Nétrine-1 n'est pas seulement un facteur de survie mais aussi un facteur anti-apoptotique via son action sur DCC. Ces résultats ont été confirmés *in vivo* : l'électroporation d'un vecteur codant DCC dans la moëlle épinière d'embryons de poulet induit une mort neuronale massive impliquant l'activation de la caspase 3 ; phénomène réversé par la co-électroporation d'un vecteur d'expression de la Nétrine-1(Furne et al., 2008). La double fonction du couple Nétrine-1/DCC dans le guidage et la survie neuronale a conduit à la mise en place d'un modèle selon lequel les neurones exprimant DCC sont normalement attirés vers la source de Nétrine-1 (plaque du plancher) et sont éliminés par apoptose s'ils s'éloignent de cette source (**figure 20B**).

Une fois la ligne médiane franchit par les axones des neurones commissuraux, un autre couple récepteur/facteur chimoattractif prendrait le relai : le couple Robo/Slit et il a été montré sur des neurones spinaux de xénope que Robo (*Slit receptor Roundabout*) était capable d'inhiber la fonction chimiattractive de la Nétrine-1 médiée par DCC (Stein and Tessier-Lavigne, 2001). Une hypothèse est qu'au cours du développement, le couple Nétrine-1/DCC puis Robo/Slit seraient exprimés selon une séquence temporelle spécifique qui permettrait la traversée des neurones commissuraux sous l'action de la Nétrine-1 via DCC puis, une fois la ligne médiane franchit, le blocage de l'action chimioattractive de la Nétrine-1

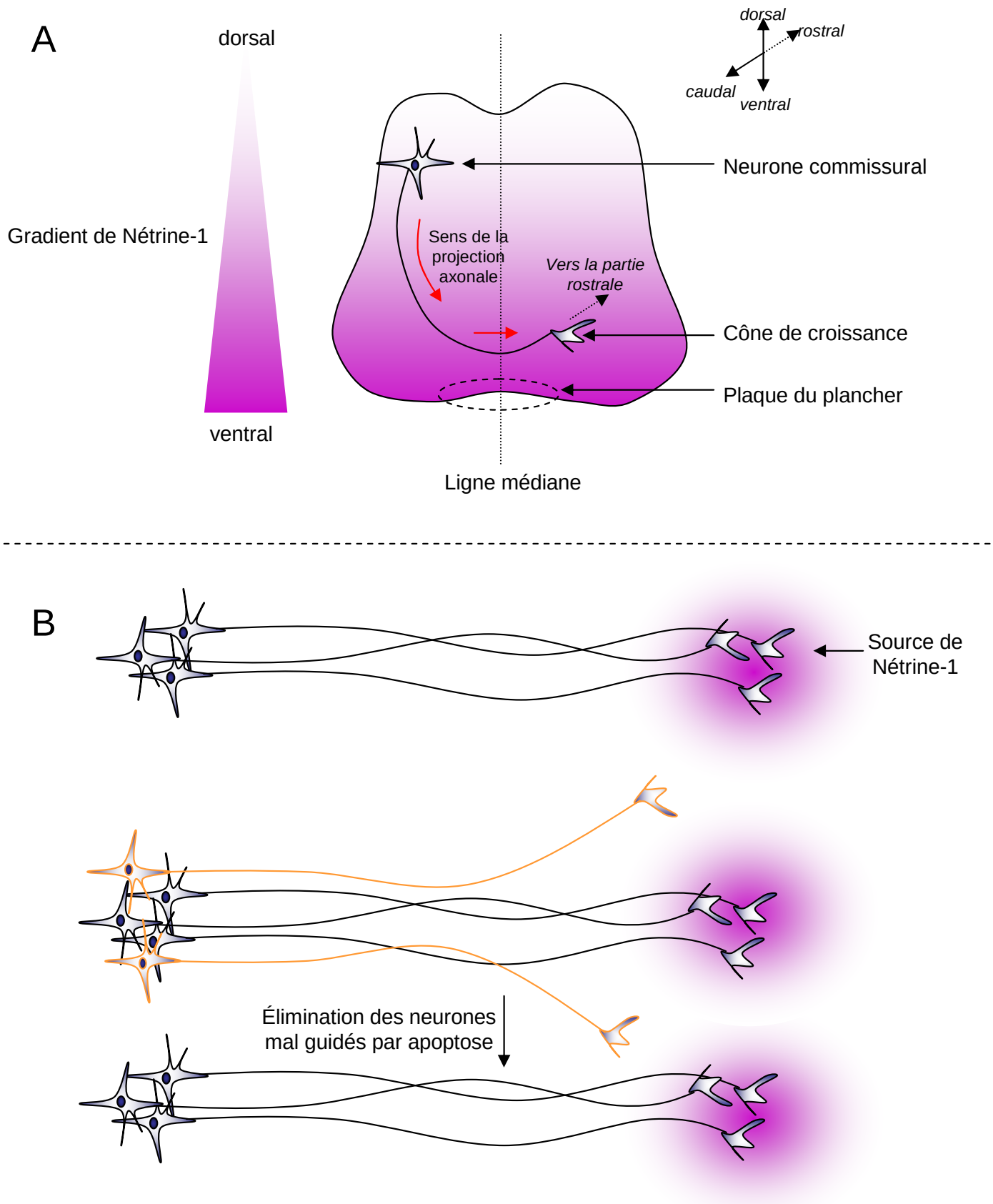


Figure 20 : Rôle de la Nétrine-1 et DCC dans le guidage axonal et la survie neuronale

A. Rôle de DCC dans le guidage des axones des neurones commissuraux de la moelle épinière. Les neurones commissuraux exprimant DCC sont attirés vers la source de Nétrine (plaque du plancher), franchissent la ligne médiane puis s'étendent en direction rostrale pour aller innervés le thalamus, la formation réticulée et le cervelet. B. Modèle de guidage induit par le couple DCC/Nétrine-1. Les neurones exprimant DCC projettent leurs axones en direction de la source de Nétrine-1 (schéma supérieur). Les neurones qui n'attendraient pas cette source (schéma central) seraient éliminés par apoptose via l'activation de la voie apoptotique induite par DCC (schéma inférieur).

(par inhibition de DCC par le récepteur Robo) au profit d'une chimioattraction médiée par le facteur Slit. Toutefois, le mécanisme moléculaire à l'origine de cette inhibition n'est pas connu.

La Nétrine-1 est également capable de stimuler la survie d'autres types neuronaux via sa fixation sur les récepteurs DCC et UNC5H. En effet, la Nétrine-1 stimule la survie des neurones olivaires (projettant leurs axones dans le cervelet), les neurones de l'hippocampe ou encore les neurones thalamocorticaux ; ces trois types de neurones exprimant DCC. De plus, il a été montré que les récepteurs UNC5H en collaboration avec DCC étaient impliqués dans la répulsion des axones. Des expériences de « *turning* » (consistant à analyser l'orientation d'un cône de croissane mis en présence d'un gradient d'une molécule) réalisées sur des neurones de moëlle épinière de xénope exposés à un gradient de Nétrine-1 révèlent que contrairement aux neurones contrôles exprimant seulement DCC qui sont attirés par le gradient, les neurones surexprimant également le récepteur UNC5H2 subissent une répulsion (Hong et al., 1999). De la même manière, le couple de récepteur UNC5H/DCC et leur ligand la Nétrine-1 ont été impliqués dans la répulsion des axones des neurones thalamocorticaux et des neurones hippocampaux (**figure 21**) (Powell et al., 2008; Williams et al., 2003b). Dans ce dernier type cellulaire une hypothèse est que le mécanisme d'internalisation d'UNC5H1 évoqué précédemment (voir partie III.D.2 p 47) participe à la régulation du processus d'attraction/répulsion indispensable au guidage axonal en séquestrant au niveau cytosolique UNC5H1. Ainsi, le cône de croissance (extrémité des axones) exprimant initialement DCC et UNC5H1 subit une chimiorépulsion en présence de Nétrine-1 et au contraire l'activation de la PKC réoriente le cône de croissance vers la source de Nétrine-1 par un mécanisme dépendant de la signalisation médiée par DCC seul (Muramatsu et al., 2009; Williams et al., 2003b). En outre, nous avons vu précédemment que le couple DCC/UNC5H induit une signalisation GMPc dépendante en présence de Nétrine-1 alors que le couple DCC/Nétrine-1 induite une signalisation AMPc/Ca^{2+} dépendante. Ces deux signalisations différentes pourraient également être à l'origine d'un remodelage cytosquelettique variable conduisant à une orientation du cône vers la source de Nétrine-1 ou bien l'inverse.

En parallèle, il a été montré que la Nétrine-1 jouait un rôle de facteur de survie neuronal via ses récepteurs UNC5H2 et UNC5H3 pour les neurones corticaux, les neurones pré-cérébelleux, et les motoneurones spinaux (Dillon et al., 2007; Llambi et al., 2001; Tang et al., 2008). En particulier, le récepteur UNC5H3 est impliqué dans la mise en place du cervelet. En effet, chez la souris, une mutation spontanée d'UNC5H3 : *rcm* (*rostral cerebellum malformation*) correspondant à une insertion de 55 acides aminés dans la région

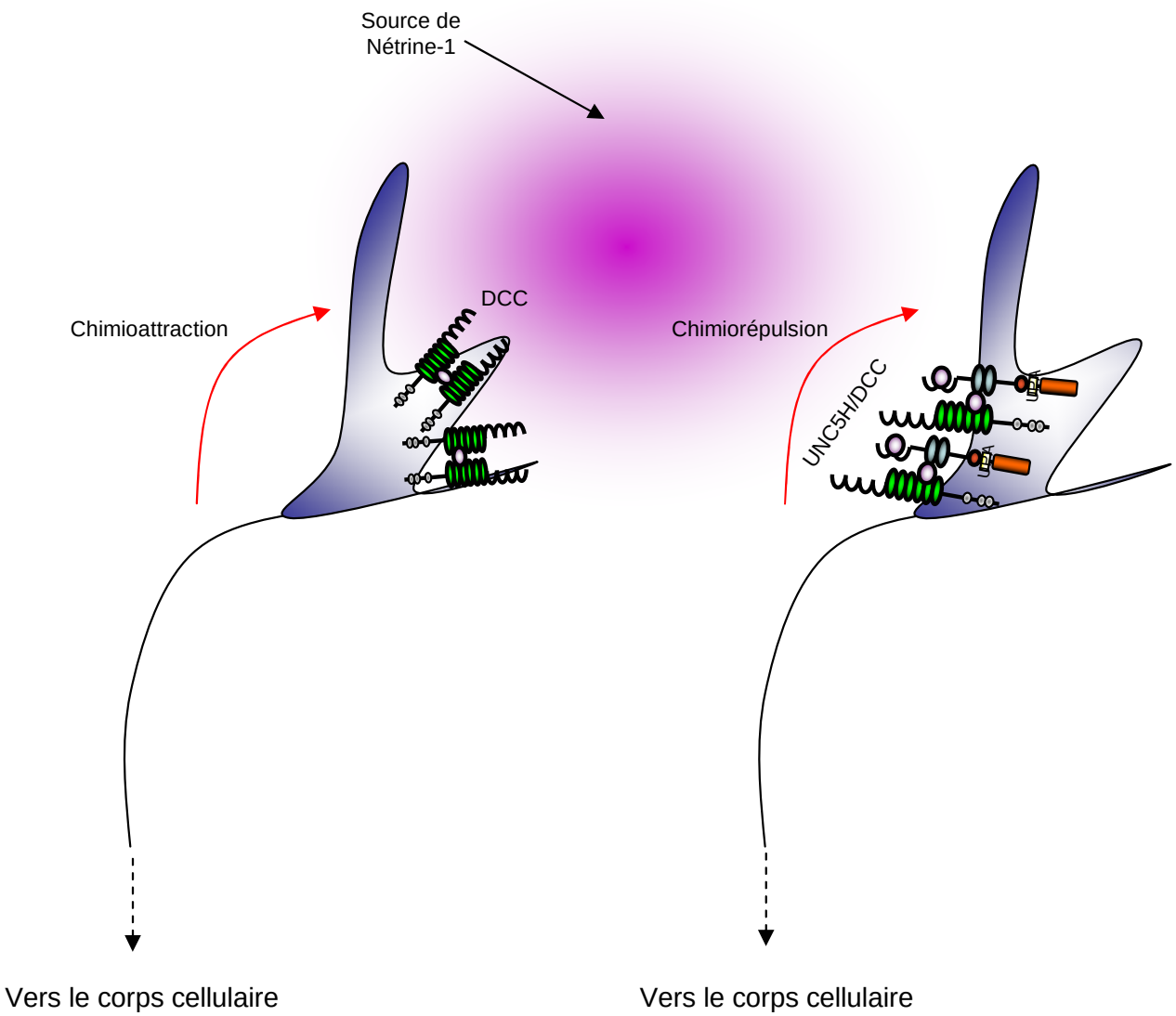


Figure 21 : Rôle complémentaires de DCC et des récepteurs UNC5H dans le guidage axonal

A proximité d'une source de Nétrine-1, les cônes de croissance de neurones exprimant uniquement DCC ou co-exprimant UNC5H adoptent une conformation différente : alors que les neurones exprimant DCC subissent une chimioattraction vers la source de Nétrine-1, les neurones exprimant DCC/UNC5H subissent une chimiorépulsion. Cette différence d'orientation du cône de croissance s'expliquerait par la différence entre les voies de signalisations induites par les homo-oligomères DCC et les héréro-oligomères UNC5H/DCC qui conduirait à un remaniement différent du cytosquelette.

intracellulaire du récepteur (entre le domaine ZU-5 et le domaine de mort) est à l'origine d'une perte de fonction du récepteur associée à une malformation du cervelet (Ackerman et al., 1997). Une hypothèse concernant la perte de fonction associée à la mutation *rcm* est que les 55 acides aminés insérés pourraient perturber la conformation du domaine intracellulaire d'UNC5H3 et inhiber ses fonctions pro et anti-apoptotiques (cf **figure 13** et II.B p36).

2. *Rôle accessoire des autres récepteurs à la Nétrine-1 dans le guidage axonal et la survie neuronale.*

Les intégrines $\alpha_3\beta_1$ ainsi que les récepteurs DSCAM et Néogénine sont impliqués dans la modulation de la fonction chimioattractive de la Nétrine-1.

En effet, il a été montré que la Nétrine-1 contrôle la migration des interneurones corticaux GABAergic via son interaction avec les intégrines $\alpha_3\beta_1$ (Stanco et al., 2009). D'autre part, les xénopes déficients pour Néogénine présentent des défauts de guidage des axones des neurones dorsaux télencéphaliques qui se projettent normalement en direction ventrale et expriment Néogénine indiquant que Néogénine est fortement impliqué dans ce processus de guidage. Toutefois, il semble que dans ce type neuronal le guidage soit médié conjointement par les deux ligands de Néogénine : la Nétrine-1 (région ventrale) et RGMa (région dorsale) car leur extinction conduit à des défauts de guidage semblables à ceux observés pour le phénotype Néogénine $^{-/-}$. Ces données ont conduit à l'élaboration d'un modèle selon lequel les neurones dorsaux télencéphaliques projetteraient leurs axones en direction ventrale vers la source de Nétrine-1 chimioattractive puis demeureraient dans cette région à cause d'un gradient dorso-ventral répulsif de RGMa (**figure 22**) (Wilson and Key, 2006). Dans ce modèle, la Nétrine-1 n'a pas été identifiée comme un facteur de survie et le rôle chimioattractif de la Nétrine-1 via sa fixation sur Néogénine évoqué dans cette étude reste à démontrer.

Le récepteur DSCAM quant à lui serait capable de compléter la fonction de guidage des axones des neurones commissuraux par la Nétrine-1 normalement médiée par DCC. En effet, il a été montré *in vivo* que l'inhibition de DSCAM par siRNA bloque la projection axonale des neurones commissuraux spinaux avant le franchissement de la ligne médiane dans d'embryons de souris. Des expériences de co-immunoprécipitations ont révélé que DSCAM interagissait avec la Nétrine-1 dans ces neurones suggérant que DCC et DSCAM pourraient avoir un rôle semblable dans ce processus de guidage Nétrine-1 dépendant. Des expériences complémentaires menées sur des neurones de moëlle épinière de xénope (exprimant DCC de manière endogène mais pas DSCAM) ont confimé que DSCAM pouvait

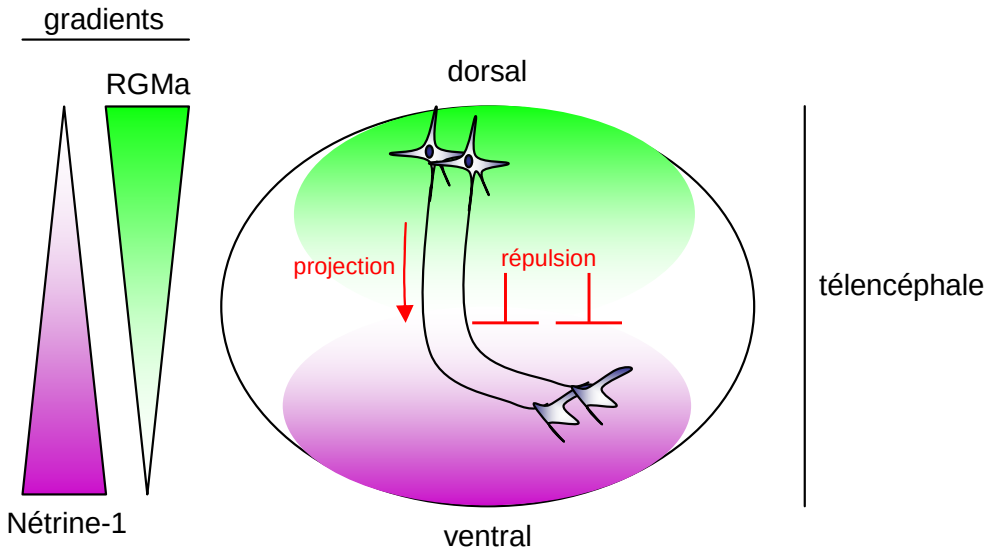


Figure 22 : Rôle de Néogénine dans le guidage axones des neurones télencéphaliques

La migration des axones des neurones télencéphaliques exprimant Néogénine le long de l'axe dorso-ventral est régulée conjointement par les ligands RGMa et Nétrine-1. Alors que RGMa exerce une action chimiorépulsive en stimule la projection axonale vers la région ventrale, la Nétrine-1 présente en région ventrale attire des cônes de croissance des axones. Cette projection ventrale serait ensuite maintenue par l'action conjointe des deux gradients : attraction par la Nétrine-1 et répulsion par RGMa.

agir en collaboration avec DCC. L'utilisation d'un anticorps anti-DCC (antagoniste de la Nétrine-1) à un effet bloquant, la surexpression de DSCAM ne modifie pas la chimioattraction par la Nétrine-1 sur ces neurones. En revanche, il a été montré que la surexpression d'un mutant dominant négatif de DSCAM délété de son domaine intracellulaire (et donc incapable de transduire un signal), restaure le pouvoir chimioattractif de la Nétrine-1 malgré la présence de l'anticorps anti-DCC (Ly et al., 2008). Ainsi, l'ensemble de ces éléments suggère que DSCAM fixe la Nétrine-1 et pourrait collaborer avec DCC dans la médiation de la chimioattraction des neurones commissuraux, en transactivant la voie de signalisation positive médiée par DCC. Plus récemment, une autre étude a montré que DSCAM est capable de médier l'attraction des neurones de la möelle épinière chez le poulet où DCC n'est pas exprimé (Liu et al., 2009). Ainsi, DSCAM et DCC auraient une action complémentaire et/ou indépendante en fonction de l'espèce considérée

Par ailleurs, il a été montré au laboratoire que la Nétrine-1 stimulerait indirectement la survie des neurones hippocampaux en se fixant sur APP. En effet, via cette fixation la Nétrine-1 inhiberait la formation des peptides Aβ (issu du clivage d'APP par des sécrétases) à l'origine des plaques β-amyloïdes responsables de la dégénérescence neuronale associée à la maladie d'Alzheimer (Lourenco et al., 2009). Toutefois, le mécanisme précis par lequel la Nétrine-1 inhibe la formation du peptide Aβ reste à élucider.

B. Rôle de la Nétrine-1 et du récepteur UNC5H2 et DCC dans l'angiogenèse

La mise en place du système vasculaire et du système nerveux présente des similitudes car ces deux mécanismes impliquent des phénomènes de prolifération, de migration cellulaire et de connexion cellulaire. En effet, l'angiogenèse correspond à la formation de vaisseaux sanguins secondaires à partir d'un réseau vasculaire pré-existant. Elle implique donc une étape de prolifération des cellules endothéliales mères puis de migration des cellules endothéliales filles et enfin leur connexion avec un autre vaisseau sanguin ou un organe cible.

La Nétrine-1 a été décrite pour la première fois en 2004 comme un facteur stimulant l'angiogenèse *in vitro* et *in vivo*. En effet, il a été montré que la Nétrine-1 tout comme les facteurs pro-angiogéniques déjà connus (VEGF et PDGF), stimule la prolifération de lignées endothéliales en culture et permet également la formation de nouveaux vaisseaux sanguins sur la membrane chorio-allantoïdienne d'embryons de poulet et sur la cornée de souris (Park et al., 2004a). Par la suite, il a été montré que l'activité pro-angiogénique de la Nétrine-1 était liée plus particulièrement à sa fixation sur le UNC5H2 et que cette activité était liée d'une

part à une fonction de facteur de survie de la Nétrine-1 pour les cellules endothéliales mais aussi d'autre part à une fonction anti-apoptotique de la Nétrine-1 liée à sa fixation sur UNC5H2 (Castets M., 2009; Navankasattusas et al., 2008). En effet, l'inhibition par siRNA de la Nétrine-1 induit la mort des cellules endothéliales veineuses et artérielles en culture (HUVEC et HUAEC), phénomène réversé par la co-transfection d'un siRNA UNC5H2 ou d'un siRNA DAPk dans ces cellules. De la même manière l'inhibition de la Nétrine-1a (homologue de la Nétrine-1 humaine) par morpholino chez le zebrafish induit la mort massive des cellules endothéliales et des défauts majeurs dans la mise en place du système vasculaire (absence des vaisseaux dorsaux, ventraux et/ou absence des vaisseaux intersegmentaires), ce phénotype étant réversé par la co-injection d'un morpholino anti-UNC5H2 ou d'un morpholino anti-DAPk démontrant bien l'importance de la voie de signalisation apoptotique induite par le récepteur UNC5H2 dans la régulation de la fonction angiogénique de la Nétrine-1 (Castets et al., 2009; Yang et al., 2007b).

V. Les récepteurs UNC5H, DCC et leur ligand la Nétrine-1 : implication dans la morphogénèse tissulaire et la régulation de l'homéostasie

Chez l'adulte l'expression des récepteurs DCC, UNC5H et de la Nétrine-1 est ubiquitaire. Leur rôle est assez mal connu mais récemment, plusieurs études suggèrent que la Nétrine-1 et ses récepteurs à dépendance ont un rôle dans l'homéostasie, la morphogénèse et l'adhésion tissulaire. Alors que plusieurs études impliquent la Nétrine-1– pour l'instant indépendamment des récepteurs à dépendance DCC et UNC5H- dans le développement de l'oreille interne, l'adhésion des cellules mammaires, et enfin le développement du pancréas, la Nétrine-1 et ses récepteurs à dépendance ont été impliqués dans des processus d'adhésion cellulaire, de migration et d'homéostasie en particulier dans le poumon, le rein, l'os, la peau et enfin le colon. En particulier, il a été montré dans ce dernier tissu que les récepteurs UNC5H3 et DCC auraient une fonction de suppresseur de tumeur en régulant l'homéostasie de l'épithélium intestinal sous l'action d'un gradient de Nétrine-1.

A. Rôles de la Nétrine-1 dans la morphogenèse de l'oreille interne, de la glande mammaire et du pancréas

Quelques études ont montré que La Nétrine-1 était capable de contrôler la morphogenèse, l'homéostasie et l'adhésion dans l'oreille interne, la glande mammaire et le pancréas via ses récepteurs Néogénine et les intégrines α6β4 et α3β1.

1. Rôle de la Nétrine-1 dans la mise en place de l'oreille interne

Au cours du développement, il a été montré que La Nétrine-1 était indispensable à la formation de l'oreille interne au cours du développement. Initialement l'oreille interne est constituée de trois feuillets cellulaires discoïdaux d'origine ectodermique (E12 chez la souris) qui vont donner naissance à des canaux semi-circulaires distincts suite à un détachement des cellules épithéliales de la lame basale et une mort cellulaire massive (E12.5). Les souris Nétrine-1$^{-/-}$ présentent des feuillets cellulaires persistants à E12 et une absence de canal semi-circulaire distincts. L'apoptose massive et le détachement de la lame basale observée à E12.5 seraient donc contrôlés par l'expression de la Nétrine-1 (localisée au centre des disques épithéliaux primordiaux) mais le récepteur à l'origine de cette mort n'a pu être identifié (**figure 23**) (Abraira et al., 2008; Salminen et al., 2000).

2. Néogénine et Nétrine-1 dans la glande mammaire

La glande mammaire est un assemblage de lobes mammaires eux-mêmes subdivisés en lobules constitués d'acini à l'origine de la fabrication du lait. Un acinus comporte plusieurs types cellulaires : des cellules luminales (qui vont excréter le lait) dérivant de cellules peu différenciées : les cellules pré-luminales, elles-mêmes issues de la prolifération de cellules souches sous-jacentes: les « cap cells ». Le canal formé par les cellules luminales est englobé par des cellules myoépithéliales contractiles qui vont permettre l'évacuation du lait vers les canaux excréteur au cours de la lactation (**figure 24**).

Il a été montré que la Nétrine-1, exprimée par les cellules pré-luminales avait un rôle essentiel dans le maintien de cette structure en collaboration avec son récepteur Néogénine exprimé par les cap cells (Srinivasan et al., 2003). En effet, des souris déficientes pour la Nétrine-1 ou Néogénine au niveau de leur glande mammaire présentent une désolidarisation des couches cellulaires des acini : les cellules pré-luminales se détachent des « cap cells » formant des lacunes acinales. Les souris Nétrine-1$^{-/-}$ n'étant pas viable, ces expériences ont été réalisées grâce à la greffe de primordia de glandes mammaires issus d'embryons Nétrine-1$^{-/-}$ sur des souris sauvages. On peut donc se demander si le phénotype observé est représentatif du rôle physiologique de la Nétrine-1 dans la glande mammaire car plusieurs paramètres pourraient interférer tels que le degré de différenciation des cellules mammaires, l'inflammation locale potentiellement induite par la greffe ou encore le degré de colonisation de la greffe par les cellules mammaires de la souris receveuse de la greffe. En outre, une

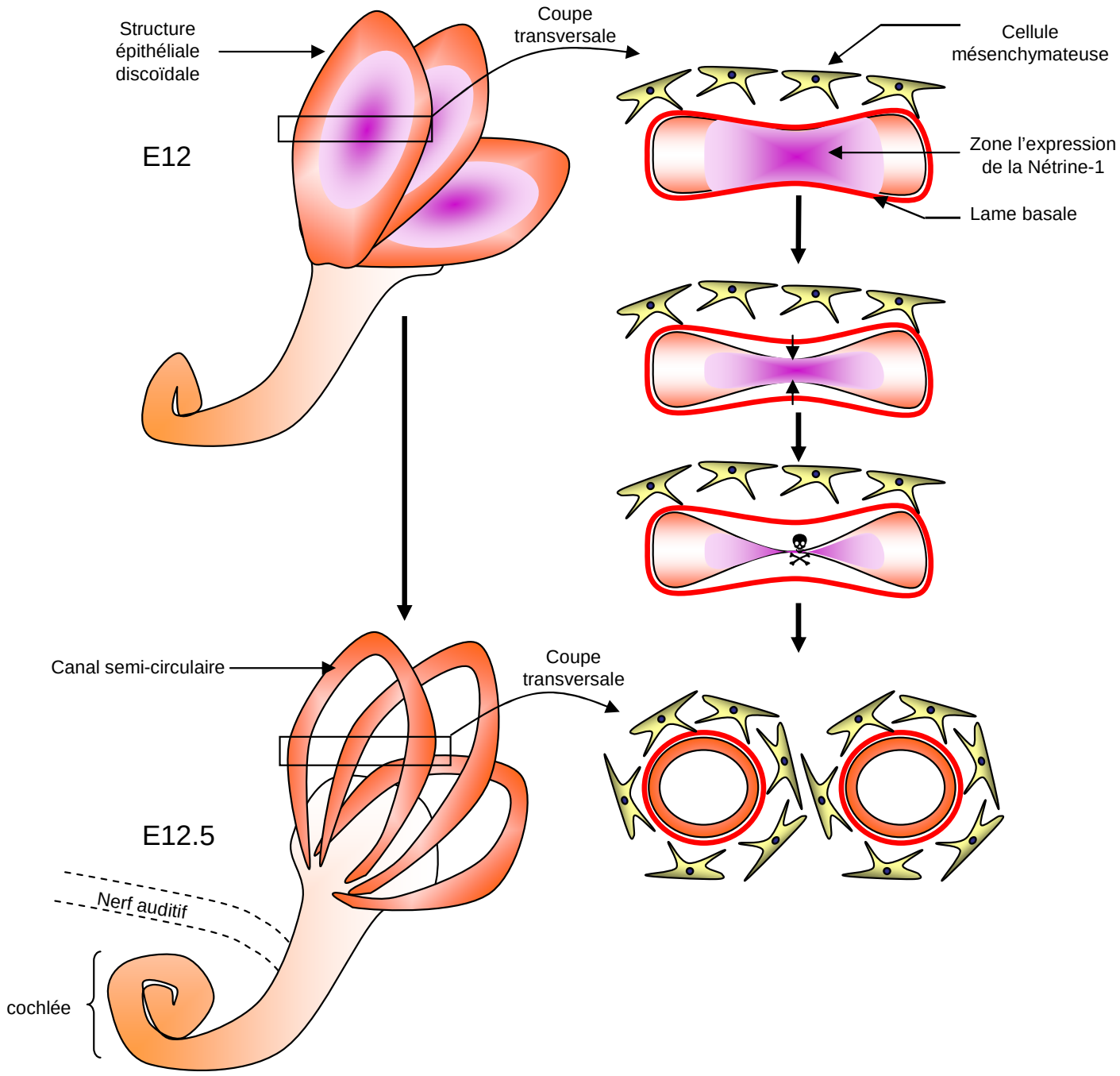


Figure 23 : Rôle de la Nétrine-1 dans le développement de l'oreille interne

Les canaux semi-circulaires de l'oreille interne se forment entre E12 et E12.5 sous l'action de la Nétrine-1. La quantité de Nétrine-1 produite au niveau central des primordiaux discoïdaux décroît progressivement au cours du développement ce qui induit par un mécanisme inconnu, un détachement des cellules épithéliales de la lame basale et une mort cellulaire massive au centre de ces primordia permettant ainsi l'émergence de trois canaux semi-circulaires distincts.

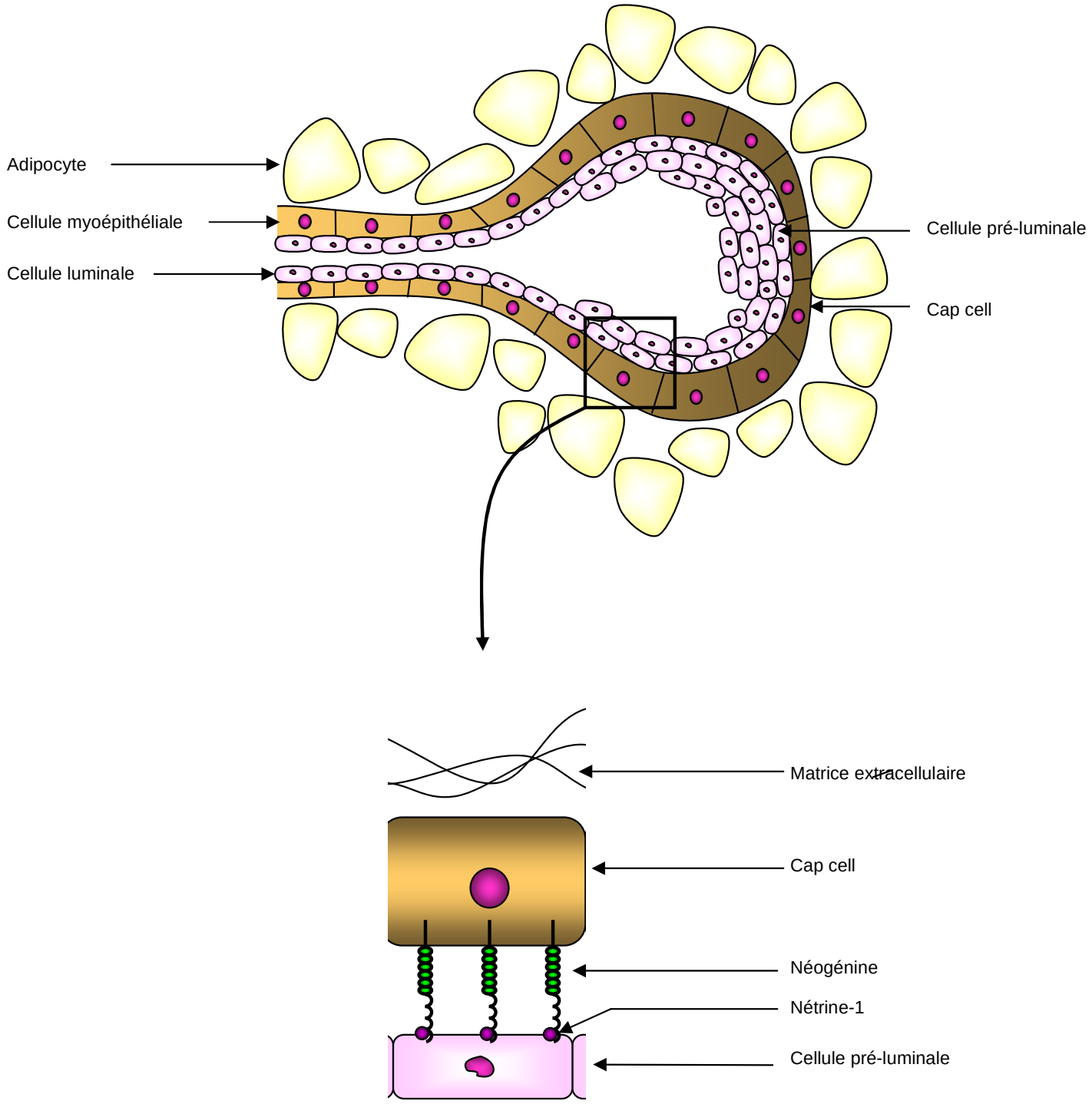


Figure 24 : Rôle de la Nétrine-1 et du récepteur Néogénine dans le développement de la glande mammaire

La glande mammaire est constituée de plusieurs couches cellulaires concentriques : la matrice extracellulaire, les cap cells et les cellules pré-luminales qui se différencient en cellules luminales. Un troisième type cellulaire entoure le canal excréteur : les cellules myoépithéliales. La Nétrine-1, via sa fixation sur le récepteur Néogénine participerait au maintien structural de la glande mammaire en stimulant en particulier l'adhésion des cellules pré-luminales (exprimant la Nétrine-1) et les cap cells (exprimant Néogénine).

étude antérieure avait décrit le rôle essentiel des cadhérines dans l'adhésion entre ces deux couches cellulaires (Daniel et al., 1995).

3. Rôle de la Nétrine-1 dans le pancréas

Le pancréas est un organe branché sur l'intestin qui va participer à la digestion ainsi qu'à l'assimilation des sucres. Il est constitué de deux types de glandes : des glandes exocrines qui vont produire les enzymes nécessaire à la digestion et qui sont connectées à un canal excréteur pancréatique ; et des glandes endocrines également appelées îlots de Langerhans qui sont isolées du canal excréteur et vont produire des hormones telles que l'insuline.

Au cours du développement pancréatique, la Nétrine-1 est exprimées au niveau prénatal (E15 à E18 chez la souris) puis plus tardivement chez l'adulte par les îlots de Langerhans sous certaines conditions. En effet, dans le pancréas adulte, la Nétrine-1 n'est pas exprimée sauf en cas de fermeture anormale du canal pancréatique qui induit un phénomène de régénération pancréatique (De Breuck et al., 2003). Il a également été montré que la Nétrine-1 stimulait la migration des cellules pancréatiques *in vitro* suggérant qu'elle pouvait ainsi participer au développement pancréatique en induisant la migration cellulaire (De Breuck et al., 2003). Une autre étude menée par l'équipe Cirulli a révélé que la Nétrine-1 était produite par certaines cellules des acini des glandes exocrines ainsi que par certaines cellules du canal pancréatique au cours du développement. La Nétrine-1 ainsi produite est capable de se fixer sur les intégrines $\alpha_6\beta_4$ et $\alpha_3\beta_1$ avec une haute affinité et de stimuler la migration et l'adhésion des cellules épithéliales pancréatiques *in vitro*. En particulier, la Nétrine-1 stimule la migration des progéniteurs pancréatiques (cytokeratine 19^+/PDX 1^+) suggérant que la Nétrine-1 aurait un rôle direct dans la morphogenèse pancréatique (exocrine et endocrine) en stimulant l'expansion des acini (**figure 25**)(Yebra et al., 2003). De plus, les îlots de langherans dérivant de cellules d'origine exocrine, cette étude suggère également que la Nétrine-1 produite par la glande exocrine pourrait contrôler la formation des îlots en stimulant la migration de leurs précurseurs cellulaires (**figure 25**). Après cette étape de morphogenèse, la Nétrine-1 ne serait plus produite afin d'éviter toute prolifération cellulaire anormale pouvant conduire à des dysfontionnement pancréatique.

B. Rôle de la Nétrine-1 et de ses récepteurs DCC et UNC5H dans la morphogenèse, l'adhésion et l'homéostasie

1. Nétrine-1 et -4 et UNC5H2 dans le poumon

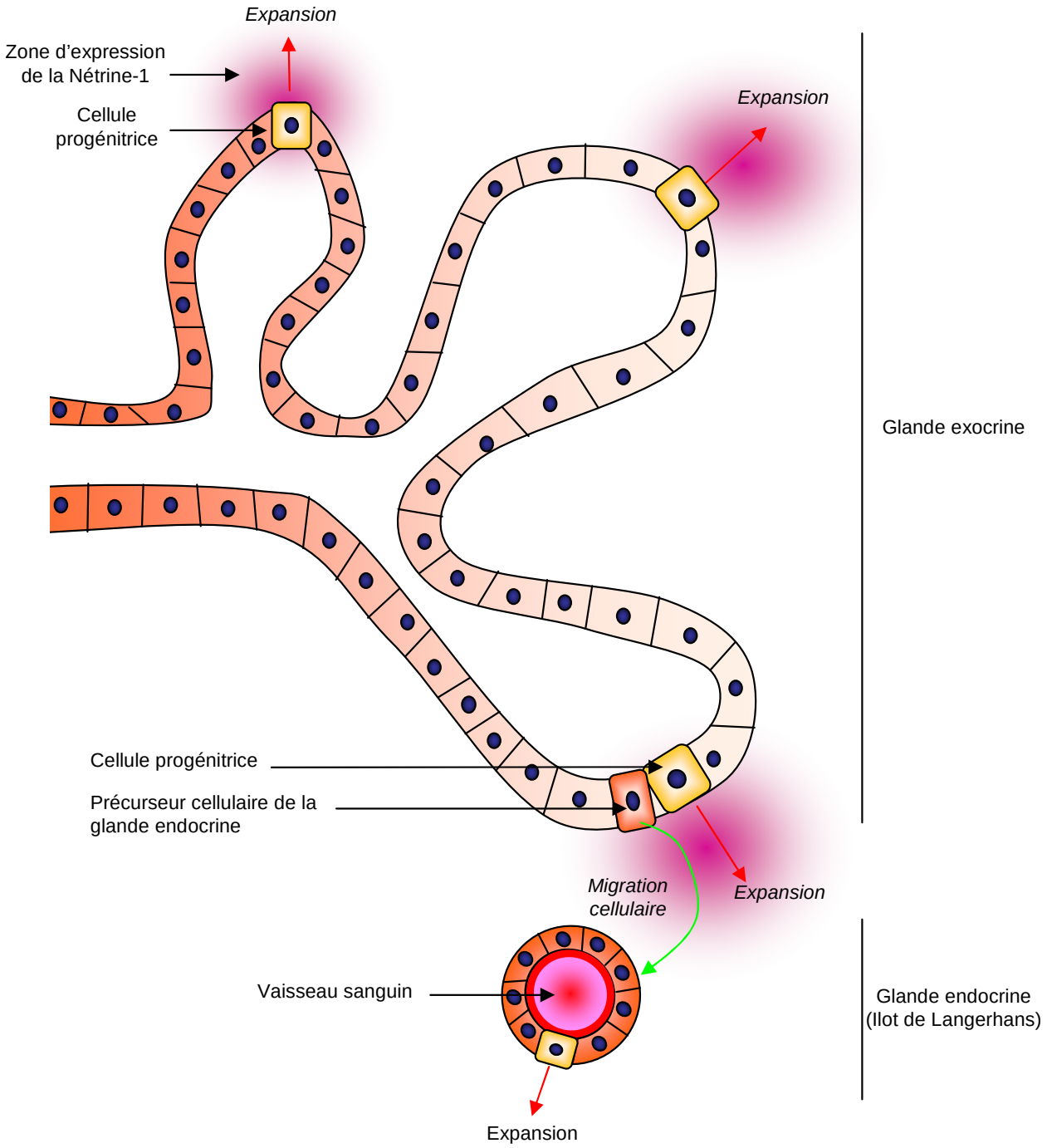


Figure 25 : Rôle de la Nétrine-1 dans le développement du pancréas

Le pancréas est formé de glandes exocrines et endocrines (Ilots de Langerhans). La composante exocrine se forme à partir à partir d'un canal central issu de l'intestin se subdivisant en acini qui vont ensuite subir une expansion. La composante endocrine dérive de la migration de certaines cellules de la glande exocrine et se forme donc plus tardivement au cours du développement. Dans les deux cas, le processus de migration (en vert) et le processus d'expansion (en rouge) seraient contrôlés par un gradient de Nétrine-1 formé par les cellules progénitrices. La Nétrine-1 via sa fixation sur les intégrines $\alpha_3\beta_1$ et $\alpha_6\beta_4$ serait à l'origine de ces deux phénomènes.

Les deux poumons sont issus de l'évagination de l'endoderme ventral qui forme deux bourgeons primordiaux à partir du 9ème jour de développement chez la souris. Ces bourgeons correspondent à un épithélium entouré par un manchon de cellules mésanchymateuses qui se subdivisent en bronchioles au cours du développement sous l'action de facteurs de croissance tels que le FGF-7 et FGF-10 (*Fibroblast Growth Factor*) d'origine mésanchymateuse (Cardoso, 2000; Liu et al., 2004; Warburton et al., 2000).

Des hybridations *in situ* ont révélé que la Nétrine-1 tout comme la Nétrine-4 sont produites par les cellules épithéliales proximales mais sont exclues des extrémités des bronchioles au contraire du récepteur UNC5H2. Afin d'étudier le rôle des Nétrine-1 et -4 dans le développement pulmonaire, des primordia endodermiques (explants pré-pulmonaires) ont été mis en culture dans du matrigel et traitées avec du FGF-7 et 10 et/ou de la Nétrine. Ainsi, il a été montré que les FGF sont capables d'induire à la surface des primordia, la formation de bourgeons à qui vont donner naissance aux bronchioles. Au contraire, un co-traitement avec la Nétrine-1 ou -4 inhibe totalement le processus et des analyses en microscopie confocale montrent que les cellules endothéliales normalement à l'origine de la formation de bourgeons externes sont en fait invaginées dans cette condition. Ces résultats suggèrent que les Nétrine-1 et -4 régulent la migration des cellules : elles inhibent la migration des cellules proximales et orienteraient ainsi la migration des cellules distales sous l'action du FGF-7 et FGF-10 notamment via l'activation des MAPK qui vont être à l'origine d'un remaniement cytosquelettique (**figure 26**)(Liu et al., 2004). Le récepteur UNC5H2 pourrait également être impliqué dans la morphogenèse pulmonaire : la Nétrine-1 pourrait former un gradient allant des cellules proximales aux cellules distales et il y aurait un ratio UNC5H2/Nétrine-1 variable le long de l'épithélium pulmonaire. Au niveau proximal, la Nétrine-1 serait présente en excès et stimulerait en collaboration avec les FGFs la prolifération et la survie cellulaire via l'activation des MAPK (ERK1/2) en se fixant sur UNC5H2. A l'extrémité du bourgeon pulmonaire, seul les FGFs seraient présent et stimuleraient à eux seuls les MAPK entraînant une élongation cellulaire plutôt qu'une prolifération. Aucun phénomène d'apoptose n'a été observé au niveau distal sur ces bourgeons pulmonaires suggérant que le récepteur UNC5H2 en absence de Nétrine-1 est ici inactif. Une hypothèse est que l'activation des MAPK par les FGF bloque l'apoptose normalement induite par UNC5H2 en absence de Nétrine-1.

Un autre groupe a montré que DCC est également exprimé au cours du développement pulmonaire et qu'il colocalise avec UNC5H2 suggérant que DCC et UNC5H2 pourraient collaborer pour médier l'action de la Nétrine-1 (Dalvin et al., 2003).

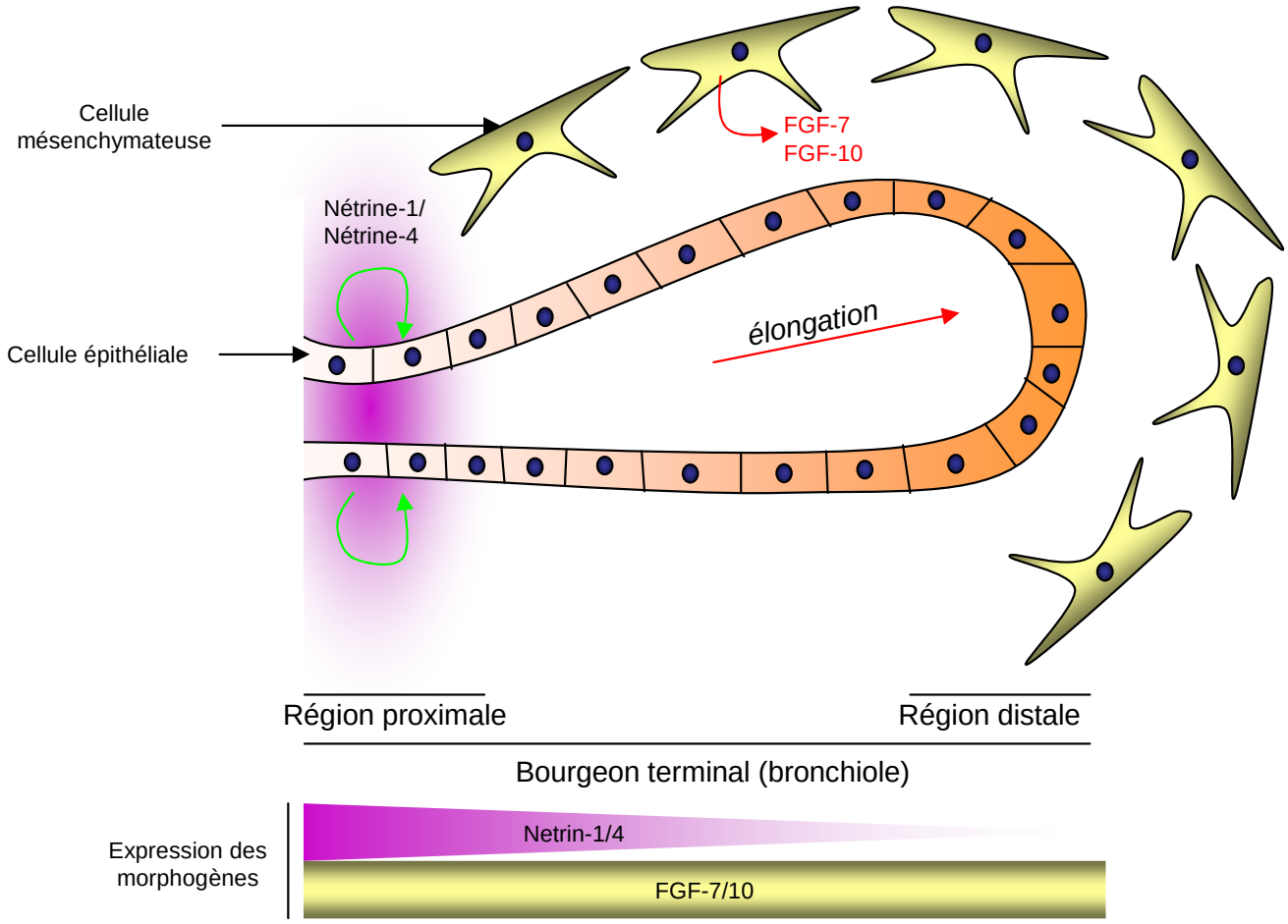


Figure 26 : Rôle de la Nétrine-1 et de la Nétrine-4 dans la morphogenèse pulmonaire.

Les Nétrine-1 et Nétrine-4 sont produites au cours de la morphogenèse pulmonaire par les cellules proximales des bourgeons terminaux en cours d'élongation. Ces Nétrines inhiberaient l'apparition de bourgeon ectopique en bloquant la migration cellulaire (flèches vertes). Au contraire, les FGF-7 et 10 produits par les cellules mésenchymateuses stimulent la prolifération cellulaire et l'élongation du bourgeon au niveau distal (flèches rouges). Les quantités respectives des Nétrines et des FGFs tout au long du bourgeon terminal pulmonaire sont illustrées par le diagramme inférieur.

2. UNC5H2 et Nétrine-1 dans le rein

Le rein est constitué d'unité de filtration du sang appelé néphrons. Un nephron est constitué d'un glomérule qui va filtrer le sang et envoyer le filtrat vers la anse de Henlé, une structure tubulaire bordée par deux parties : un canal proximal et un canal distal débouchant sur le canal collecteur évacuant les urines.

Très récemment, il a été montré que l'homéostasie rénale pouvait également être régulée par la Nétrine-1 via son récepteur UNC5H2. En effet, il a été montré *in vitro* que la Nétrine-1 était produite par les cellules épithéliales rénales de souris et qu'elle stimulait via son récepteur UNC5H2 la prolifération et la migration de cellules tubulaires proximales primaires de souris. L'effet de la Nétrine-1 sur la prolifération cellulaire est lié à l'activation de la voie ERK1/2 mais la voie de signalisation responsable de l'effet observé sur la migration cellulaire reste à identifier (Wang et al., 2009c). La Nétrine-1 exercerait également un rôle protecteur en augmentant le taux de survie cellulaire en cas d'ischémie-reperfusion (phénomène souvent observé suite à des greffes et générant des ROS toxiques pour le rein) (Wang et al., 2009b). Ainsi, le couple Nétrine-1/UNC5H2 pourrait contrôler l'homéostasie rénale en permettant aux cellules rénales tubulaires de proliférer et de migrer pour remplacer les cellules endommagées par les ROS (**figure 27**).

3. Rôle d'UNC5H2, DCC et de la Nétrine-1 dans la peau et l'os

Très récemment, il a été montré que certains mélanomes présentent une surexpression de Nétrine-1 et du récepteur UNC5H2 suggérant que ce couple ligand/récepteur pourrait avoir un rôle dans l'homéostasie cutanée. Toutefois, cette étude révèle que la Nétrine-1 ne stimule ni la prolifération, ni la survie de ces cellules tumorales. En effet, l'inhibition de la Nétrine-1 par siRNA dans des lignées de mélanomes ne permet pas d'observer une variation de ces paramètres. Il est néanmoins à noter que le siRNA Nétrine-1 affecte le pouvoir migratoire des cellules tumorales de mélanomes (Kaufmann et al., 2009). Ainsi, dans ce type de cancer, la Nétrine-1 pourrait avoir un rôle dans l'échappement métastatique plutôt que dans l'échappement tumoral.

Le Nétrine-1 est également associée à la migration d'un autre type cellulaire : les chondrocytes via sa fixation sur DCC en cas d'ostéoarthrite. Les chondrocytes forment le cartilage qui englobe et protège du frottement les extrémités osseuses au niveau des articulations. L'ostéoarthrite est une pathologie de type inflammatoire correspondant à une destruction progressive du cartilage et il a été observé que dans ces conditions, les

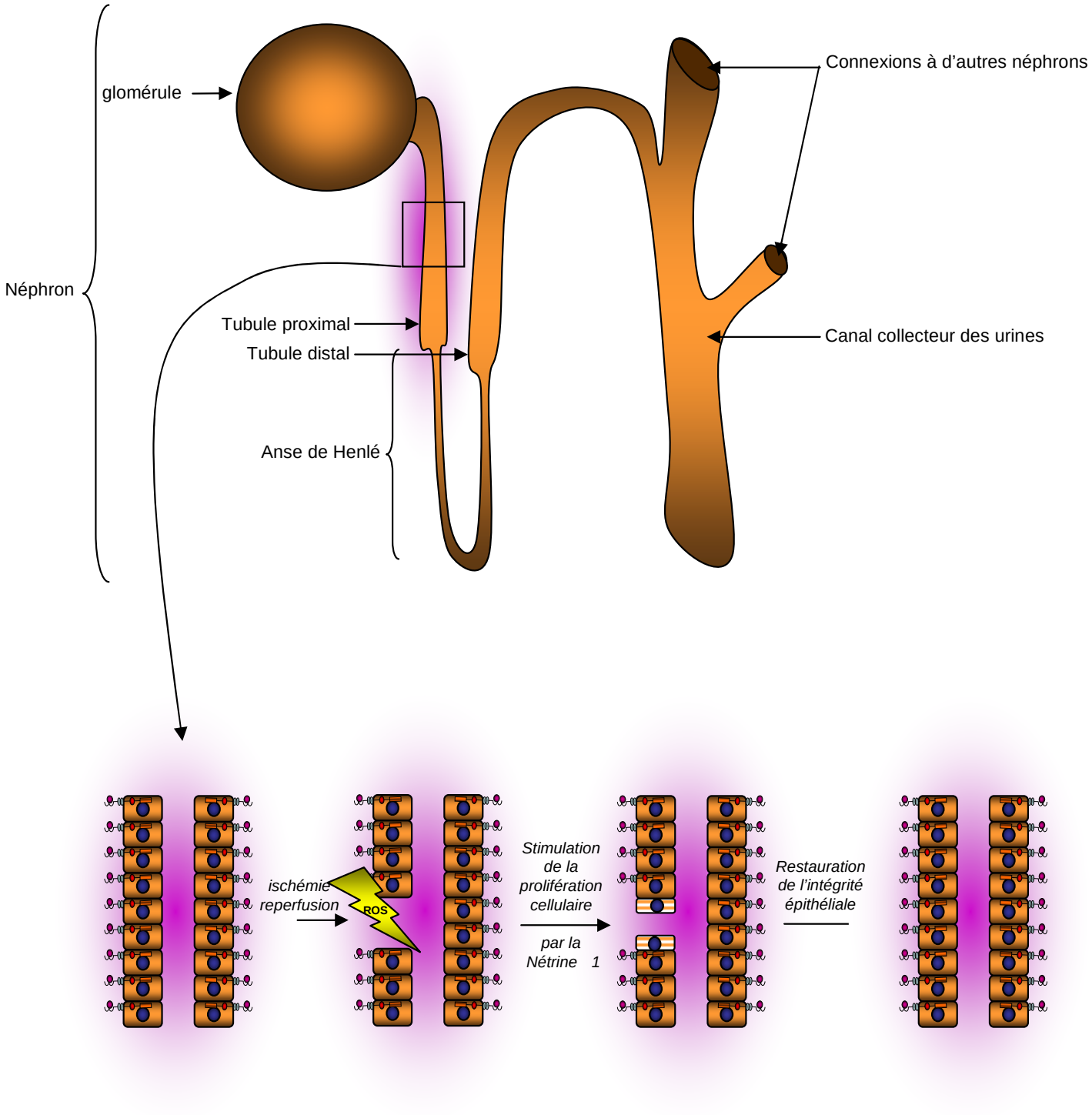


Figure 27 : Rôle de la Nétrine-1 et du récepteur UNC5B dans le rein

La Nétrine-1 est produite par les cellules rénales du tubule proximal et permettrait via sa fixation sur son récepteur UNC5B de stimuler la prolifération des cellules épithéliales tubulaires afin de réparer d'éventuelles lésions causées par l'ischémie reperfusion.

chondrocytes surexpriment DCC et que la Nétrine-1 via DCC, exerce une action chémoattractive sur ces cellules *in vitro* (Schubert et al., 2009). Cette observation suggère que la Nétrine-1 pourrait stimuler la migration des chondrocytes *in vivo* et participer à la dégénérescence du cartilage mais cela reste à démontrer. Par ailleurs, le type cellulaire produisant la Nétrine-1 au niveau articulaire reste à identifier.

C. Fonction suppresseur de tumeur des récepteurs DCC et UNC5H

1. Le rôle de suppresseur de tumeur de DCC et du récepteur UNC5H3 dans le colon

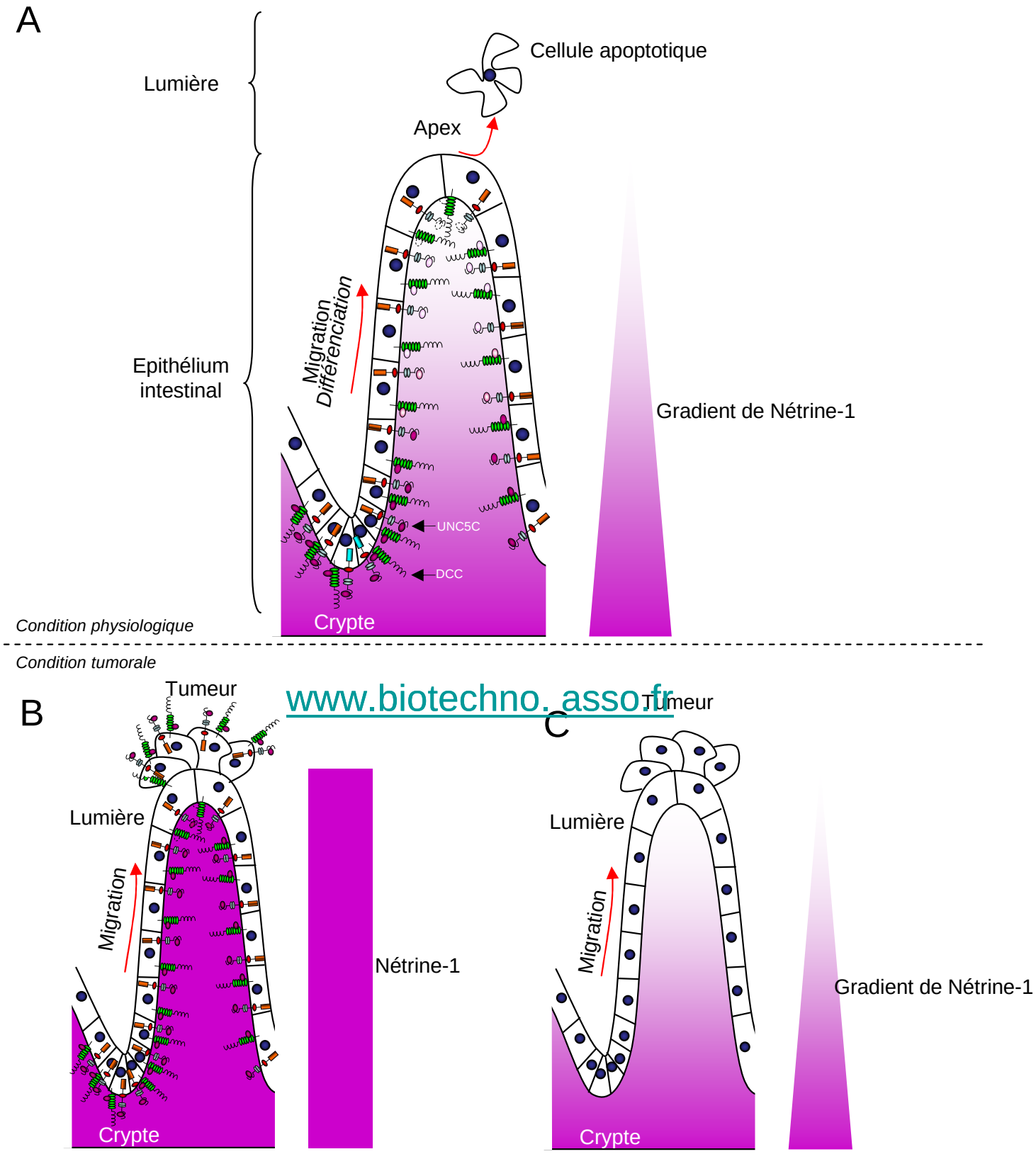
L'expression de DCC et des récepteurs UNC5H est perdue dans de nombreux types de cancers et plus particulièrement dans les cancers colorectaux. Cette perte d'expression est liée à une hyperméthylation de l'ADN (au niveau de la région promotrice du gène) ou bien à une perte d'hétérozygotie (ou LOH pour Loss Of Heterozygoty) (Bernet et al., 2007; Shin et al., 2007; Thiebault et al., 2003). Dans le cas du récepteur DCC, son absence d'expression peut également être liée à la perte du fragment chromosomique 18q21 (Thiagalingam et al., 1996). Ces pertes d'expression des récepteurs à dépendance dans les cancers suggèrent qu'ils ont une fonction de suppresseur de tumeur mais il est à noter que le fragment 18q21 comporte d'autres gènes potentiellement suppresseur de tumeurs tels que les gènes *smads*, contrôlant notamment le cycle cellulaire (Thiagalingam et al., 1996).

Afin d'établir plus clairement le rôle de suppresseur de tumeur de DCC, notre laboratoire a tout d'abord étudié l'expression physiologique de DCC et de la Nétrine-1 dans le colon. Ainsi, des expériences d'hybridations *in situ* et d'immunohistochimie ont permis de montrer que DCC est exprimé par les cellules épithéliales orientées vers la lumière intestinale et que la Nétrine-1 quant à elle est présente dans les cryptes intestinales. Le colon est un tissu capable d'autorenouvellement grâce aux cellules souches présentes dans les cryptes. En effet, ces cellules peu différenciées sous l'action de facteurs de croissance sont capables de se multiplier puis de migrer tout en se différenciant vers l'apex des villosités. Les cellules qui atteignent l'apex meurent ensuite par apoptose et sont éliminées dans la lumière intestinale. Cet autorenouvellement permet le maintien de l'intégrité de la paroi intestinale en favorisant l'élimination des cellules épithéliales endommagées ou infectées : en effet, malgré la présence d'une flore commensale protectrice indispensable à la digestion, certains pathogènes peuvent infecter les cellules épithéliales intestinales (notamment les enterocoques et les enterovirus) et provoquer des pathologies aïgues (diarrhées le plus souvent) qui peuvent se tranformer en septicémie si les pathogènes parviennent à passer dans le sang circulant.

Afin d'établir le rôle de la Nétrine-1 et de DCC dans l'homéostasie intestinale, nous avons émis l'hypothèse que la Nétrine-1 présente dans les cryptes est à l'origine de la prolifération des cellules souches cryptiques et de part sa nature de facteur diffusible formerait un gradient allant des cryptes vers l'apex des villosités. Selon cette hypothèse, le taux de Nétrine-1 serait suffisant à la survie des cellules épithéliales intestinales au cours de leur migration et de leur différenciation mais insuffisant pour permettre leur maintien au niveau de l'apex. A ce niveau les cellules seraient éliminées via l'induction de la voie pro-apoptotique DCC (**figure 28A**).

Pour tester cette hypothèse, des souris transgéniques surexprimant la Nétrine-1 (Tg-Net) au niveau intestinal ont été réalisées et analysées. Il a été montré que ces souris présentent des hyperplasies intestinales (colon et intestin grêle) liées à une hyperprolifération et à une survie accrue des cellules intestinales (Mazelin et al., 2004). De plus, les souris [APC $^{(+/1638N)}$, Tg-Net] obtenues après croisement des souris Tg-Net avec des souris hétérozygotes mutées pour un gène suppresseur de tumeur dans le colon : APC (*Adenomatous Polyposis Coli*) présentent environ 60% d'adénocarcinomes de haut-grade contre 17% environ pour les souris APC$^{(+/1638N)}$ seule (Mazelin et al., 2004). Ainsi, la surexpression intestinale de Nétrine-1 est un facteur suffisant à l'initiation tumorale aggravée par la mutation du suppresseur de tumeur APC dans un contexte intestinal (**figure 28B**). En parallèle de cette étude, d'autres souris transgéniques exprimant un mutant non-apoptotique de DCC (DCC-D1290N) sont en cours d'étude afin de déterminer si la fonction apoptotique de DCC est également impliquée dans ce mécanisme de régulation de l'homéostasie intestinale Nétrine-1-dépendant. Si tel est le cas, les souris DCC-D1290N devraient présenter une prédisposition à la tumorigenèse colorectale. Par ailleurs, DCC semble également capable de réguler l'adhésion cellulaire. En effet, il a été montré que la surexpression de DCC dans une lignée de colon (lignée HT29) renforçait l'adhésion cellule-cellule via une interaction avec les protéines Ezrine et Merlin (protéines liant le cytosquelette) ; et au contraire réduisait l'adhésion à la matrice extracellulaire via une extinction des intégrines $\alpha_6\beta_4$ (Martin et al., 2006). L'influence de la Nétrine-1 sur ces deux évènements reste à étudier mais une hypothèse pourrait être que la mort des cellules épithéliales apicales dans le colon est liée à la fois à l'activation de la signalisation apoptotique médiée par DCC en absence de Nétrine-1 mais aussi au détachement des cellules de la matrice extracellulaire (également appelé anoïkis).

D'autres études menées au laboratoire se sont intéressées au rôle des récepteurs UNC5H dans l'homéostasie intestinale car leur expression est réduite dans plus de 60% des cancers colorectaux et ont permis de montrer que le couple UNC5H3/Nétrine-1 est également



www.biotechno.asso.fr

Figure 28 : Rôle de la Nétrine-1 et de ses récepteurs DCC et UNC5C dans l'homéostasie intestinale.

A. En condition physiologique, le renouvellement cellulaire est contrôlé par le gradient de Nétrine-1 (produite par les cryptes intestinales) et l'expression des récepteurs UNC5C et DCC. En effet, la concentration faible de Nétrine-1 à l'apex des villosités entraîne l'apoptose des cellules épithéliales via l'activation des voies de signalisation apoptotiques médiées par DCC et UNC5C.

B-C. En condition tumorale, la disparition du gradient de Nétrine-1 (B) ou la perte d'expression des récepteurs (C) ou la conduisent à une inhibition de l'apoptose des cellules apicales et prédispose au développement de tumeurs colorectales.

impliqué (Bernet et al., 2007; Thiebault et al., 2003). En effet, l'expression du gène *UNC5H3* est réduite dans 75% des tumeurs colorectales et il a pu être mis en évidence dans un modèle murin que cette perte est un facteur prédisposant à la tumorigenèse colorectale : les souris issues du croisement entre des souris UNC5H3$^{(rcm/rcm)}$ et APC$^{(+/1638N)}$ présentent deux fois plus (43%) d'adénocarcinomes de haut-grade que les souris contrôles APC$^{(+/1638N)}$ (23%) (**figure 28C**)(Bernet et al., 2007). Ainsi, le couple Nétrine-1/UNC5H3 et potentiellement le couple DCC/Nétrine-1 semblent réguler l'homéostasie intestinale et exercent un contrôle de la tumorigenèse colorectale (**figure 28**).

2. De l'inflammation aux cancers : implication de la Nétrine-1

Nous avons déjà évoqué le rôle de la Nétrine-1 comme facteur aggravant de l'ostéoarthrite car elle stimulerait la migration des chondrocytes accélérant ainsi la dégenerescence cartilagineuse. Par ailleurs, une autre étude menée au laboratoire montre qu'en condition inflammatoire (maladie de Crohn), la Nétrine-1 peut être surexprimée dans le colon et conduire à la tumorigenèse colorectale. En effet, il a été montré au laboratoire que le promoteur de la Nétrine-1 possède des domaines de fixation du facteur de transcription NFκB constituant des éléments de réponse permettant une activation transcriptionnelle en condition inflammatoire. En effet, la construction d'un vecteur rapporteur comportant le promoteur de la Nétrine-1 fusionné avec un gène luciférase a permi de montrer d'une part que ce promoteur de la Nétrine-1 peut-être activé dans des lignées tumorales intestinales surexprimant la Nétrine-1 et d'autre part que ce promoteur de la Nétrine-1 pouvait être activé par traitement au TNF (mimant l'inflammation) de cellules en culture exprimant la Nétrine-1à un taux très faible.

D'autre part, l'activation de NFκB semble être suffisante *in vivo* pour induire une surexpression de Nétrine-1 et le développement de tumeurs dans l'intestin. En effet, il a été mis en évidence dans un modèle d'inflammation intestinal murin décrit pour induire une activation de NFκB dans l'intestin, que cette inflammation était également à l'origine d'une surexpression de la Nétrine-1 dans l'intestin conduisant à la progression tumorale. De plus, le traitement de ces souris avec un peptide capable de titrer la Nétrine-1 (peptide correspondant au 4ème domaine fibronectine de DCC, DCC-4Fbn) inhibe la formation des adénocarcinomes colorectaux en condition inflammatoire, indiquant que la surexpression de la Nétrine-1 est un avantage sélectif pour la progression tumorale dans ce contexte (Paradisi et al., 2009). Ainsi, cette étude renforce l'hypothèse selon laquelle la Nétrine-1 contrôle l'homéostasie colorectale.

Le colon n'est pas le seul organe où une pathologie inflammatoire prédispose aux cancers. En effet, il a été montré que l'inflammation chronique du pancréas également appelée pancréatite était un facteur prédisposant aux cancers pancréatiques et qu'elle était associée à l'activation du facteur de transcription NFκB. Une hypothèse est donc que dans cette pathologie le facteur de transcription NFκB pourrait être à l'origine d'une réactivation de la *nétrine-1* normalement non-exprimée chez l'adulte qui pourrait activer la migration et la prolifération de certaines cellules pancréatiques et ainsi être à l'origine de la transformation tumorale (Grisham, 1999; Lowenfels et al., 1993; Paradisi et al., 2008; Steinle et al., 1999).

VI. Perte de la fonction pro-apoptotique des récepteurs à dépendance et cancers

Comme nous l'avons vu dans la première partie, la transformation tumorale est liée en partie à la perte de la fonction apoptotique. Le mode de fonctionnement des récepteurs à dépendance, et en particulier les pertes de fonction apoptotiques des récepteurs UNC5H et DCC évoquées précedemment dans la tumorigenèse colorectale, suggèrent que plusieurs mécanismes différents peuvent être à l'origine de la perte de fonction pro-apoptotique des récepteurs à dépendance : (i) la perte d'expression ou bien la perte de fonction du récepteur lui-même ou bien encore (ii) la surexpression du ligand. De manière intéressante, il a été montré pour les récepteurs DCC et UNC5H mais aussi pour les autres récepteurs à dépendance que ces deux types de pertes de fonction pouvaient être associées à la tumorigenèse suggérant que l'ensemble des récepteurs à dépendance pourraient jouer le rôle de suppresseur de tumeur tissu dépendant (**figure 29**). Par ailleurs, (iii) la perte de fonction des effecteurs de la signalisation apoptotique des récepteurs à dépendance pourrait constituer un autre mécanisme inhibiteur de la signalisation apoptotique des récepteurs à dependance et participer à la tumorigenèse. Bien que la signalisation des récepteurs à dépendance ne soit pour l'instant pas très documentée, il apparaît que la perte de fonction apoptotique des récepteurs UNC5H est associée aux cancers (**figure 29**).

Dans ce paragraphe, je détaillerai plus particulièrement les pertes de fonction apoptotique observées pour les récepteurs UNC5H et DCC (**figure 30A-D**).

A. Perte d'expression ou mutation des récepteurs UNC5H et DCC

Comme nous l'avons vu précédemment, la plupart des cancers colorectaux présentent une perte d'expression du gène DCC et UNC5H3 suite à différents processus : délétion

Classe de protéine	Récepteurs/ Régulateurs/Effecteurs	Mutation, perte de fonction apoptotique	Surexpression, Gain de fonction	Référence
Récepteurs à dépendance	**p75NTR**	Cancer de la prostate, cancers oraux		Mehlen *et al* 1998
	DCC	Majorité des cancers		Mehlen *et al* 1999
	UNC5H1-3	Cancers colorectaux, et divers autres cancers		Thiebault *et al* 2003, Bernet *et al* 2007
	Patched	Syndrôme de gorlin (anomalies du développement et prédisposition à de nombreux cancers), méduloblastomes, carcinome des cellules basales.		Thibert *et al* 2003, Ayrault *et al* 2009
	Néogénine	Cancer du sein		Lee *et al* 2005
	Récepteur aux androgènes	Cancer du poumon, cancer de l'œsophage ou cancer de la vessie ?		Teng *et al*2010
	RET	Cancer de la thyroïde, syndrôme MEN2A (*Multiple Endocrine Neoplasia type 2*)		Bordeaux *et al* 2000
	TrkC	Médulloblastomes, neuroblastomes		Yamashiro *et al*, 1997
	ALK	Leucémies et nombreux cancers		Allouche et al, 2007
	MET	Leucémies, cancer du poumon, de l'ovaire.		Tulasne et al, 2004
Ligands	**NGF**		Neuroblastome	Evangelopoulos *et al* 2004
	Nétrine-1		Cancer du colon (souris), cancer du sein, cancer du poumon, neuroblastome, pancréas, mélanomes	Mazelin *et al* 2004, Fitamant *et al* 2009, Delloye-Bourgeois *et al* 2009a et 2009b
	Shh		Cancer du pancréas (métastase), cancer du poumon non à petites cellules	Bailey *et al* 2009, Gialmanidis *et al* 2009
	NT-3		Neuroblastome	Bouzas et al, 2009
Partenaires pro-apoptotiques des voies de signalisation	**DAPk**	mélanomes, cancers pulmonaires et colorectaux		
	NRAGE	mélanomes, et cancer du pancréas (métastase)		Chu *et al*, 2007

Figure 29 : Tableau résumant les dérégulations affectant la signalisation apoptotique des récepteurs à dépendance

3 mécanismes distincts peuvent entraîner la perte de fonction apoptotique des récepteurs à dépendance : la perte de fonction du récepteur, la surexpression de ligand ou encore la perte de fonction des partenaires des voies de signalisation. Dans le cas du récepteur aux androgènes, les cancers indiqués sont associés à une réduction de la queue polyglutamine du récepteur et donc potentiellement à sa perte de fonction apoptotique. Pour les récepteurs à activité tyrosine kinase, les cancers indiqués peuvent être associés à la fois à une perte de leur fonction apoptotique ou bien à une activation constitutive de leur activité tyrosine kinase (voie positive).

chromosomique, hyperméthylation du promoteur ou LOH (**figure 30B**). De plus, des études menées au laboratoire par Marie-May Coissieux révèlent que des mutations du récepteur UNC5H3 sont également associées à des cas familiaux de cancers colorectaux (données non-publiées). En particulier, la mutation A628K située dans le domaine ZU-5 du récepteur est associée à une perte de fonction du récepteur UNC5H3 *in vitro*. La génération de souris exprimant le transgène UNC5H3-A628K permettra de vérifier si cette mutation induit une prédisposition aux cancers colorectaux après croisement avec des souris porteuses de la mutation APC. Par ailleurs, il a également été montré au laboratoire que plus de 80% des cancers rénaux et ovariens, 70% des cancers pulmonaires et 50% des cancers mammaires présentent une réduction au moins de moitié de l'expression des récepteurs UNC5H, et de la même manière l'expression de DCC est perdue dans de nombreux types de cancers et lignées tumorales dérivées de ces cancers, suggérant que ces deux récepteurs pourraient également avoir un rôle de suppresseur de tumeur dans d'autres tissus (Bernet and Fitamant, 2008; Mehlen and Guenebeaud, 2009; Thiebault et al., 2003).

B. Perte de fonction des partenaires pro-apoptotiques

Comme nous l'avons vu précédemment, seules les protéines NRAGE et la DAPk ont été décrites comme des effecteurs « fonctionnels » de la signalisation apoptotique des récepteurs UNC5H, alors que la protéine DIP13α/APPL1 décrite comme une protéine interagissant avec DCC n'a pas été clairement mise en relation avec le processus apoptotique via DCC.

Il est à noter que l'expression de NRAGE et de la DAPk est altérée dans de nombreux cancers et impliquée dans la progression tumorale. Ainsi l'expression de la DAPk est réduite ou perdue suite à l'hyperméthylation de son promoteur dans des cancers colorectaux, des cancers pulmonaires ou bien encore dans des mélanomes (**figure 30C**)(Hoon et al., 2004; Mittag et al., 2006; Pulling et al., 2009). De la même manière, il a été montré que l'expression de NRAGE est réduite dans des lignées de mélanomes et cette réduction est responsable d'une augmentation de l'agressivité des cellules cancéreuses. En effet, il a été montré par des analyses *in vitro* que la surexpression de NRAGE dans des lignées de mélanomes entraîne l'inhibition de la métalloprotéase MMP-2 et diminue ainsi le pouvoir invasif de ces cellules *in vivo* (Chu et al., 2007). Toutefois, la perte d'expression de NRAGE n'a pour l'instant pas été décrite dans des tumeurs et reste à identifier.

C. Surexpression de Nétrine-1

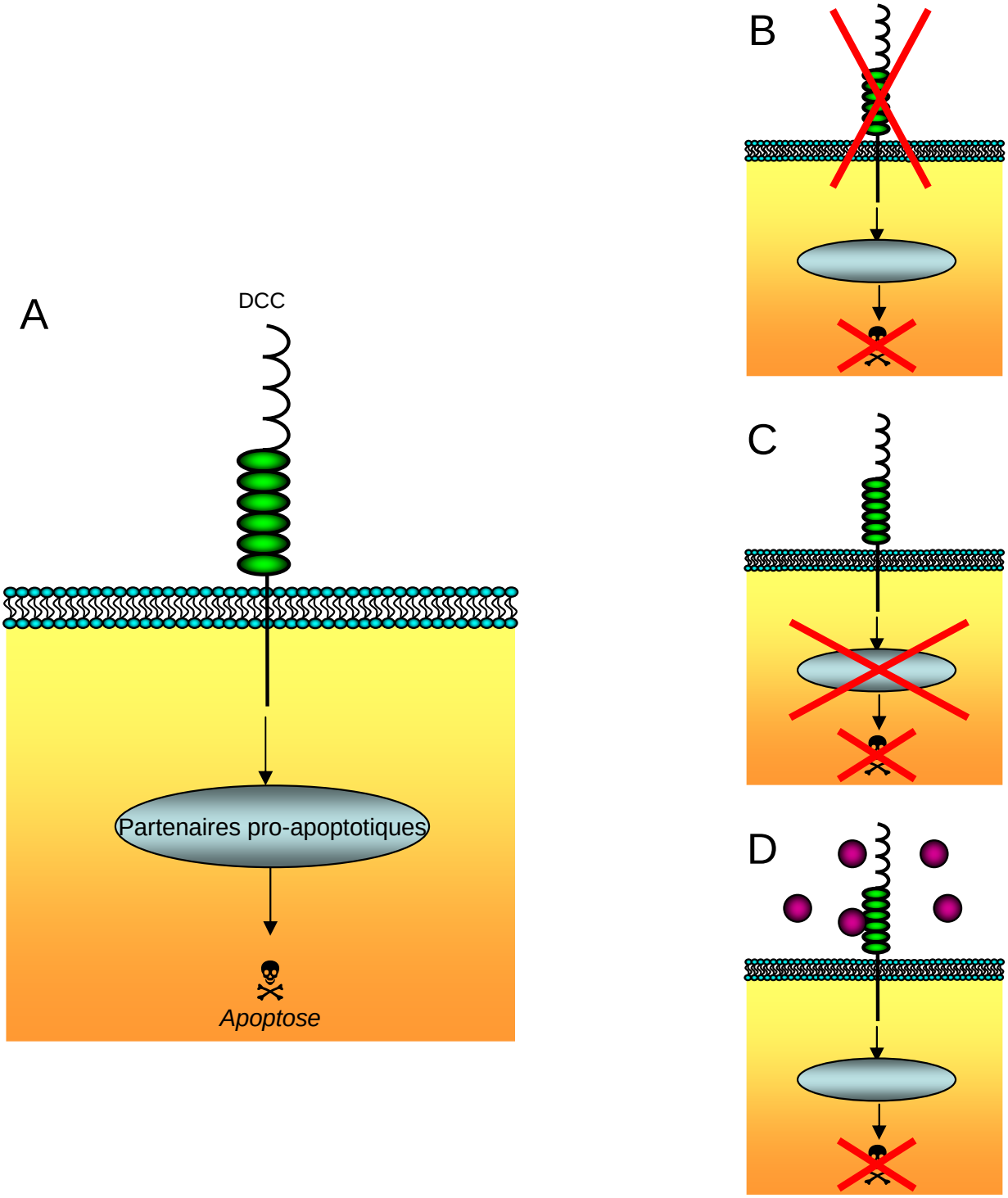


Figure 30 : Perte de fonction apoptotique des récepteurs à dépendance

Le modèle de fonctionnement des récepteurs à dépendance suggère que 3 types de dérégulation peuvent supprimer le pouvoir pro-apoptotique des récepteurs à dépendance et favoriser ainsi la tumorigenèse. Le couple récepteur/ligand représenté ici à titre d'exemple est le couple DCC/Nétrine-1. En absence de son ligand DCC recrute différents partenaires pro-apoptotiques et induit l'apoptose (A). La perte de cette fonction apoptotique peut être liée soit à une perte de fonction et/ou d'expression du récepteur (B), soit à une perte de fonction des partenaires pro-apoptotiques recrutés (C), ou encore à un gain d'expression du ligand (D).

Initialement décrite comme étant un élément suffisant à l'initiation de la tumorigenèse intestinale chez la souris, la surexpression de la Nétrine-1 a également été caractérisée dans d'autres cancers particulièrement agressifs : les mélanomes métastatiques, les neuroblastomes de stade IV métastatiques ainsi que les cancers pancréatiques avec invasion ganglionnaire et semble être à l'origine d'une agravation du phénotype tumoral (**figure 30D**).

Au laboratoire, il a été montré que la Nétrine-1 jouait le rôle de facteur de survie dans les neuroblastomes et favorisait également la dissémination métastatique *in vivo* et *in vitro*. Il a été montré que l'inhibition de la Nétrine-1 par le peptide bloquant DCC-5Fbn était suffisante à induire la mort de lignées de neuroblatomes exprimant fortement la Nétrine-1 et ce de manière autocrine. D'autre part, l'inhibition de la Nétrine-1 par ce peptide ou par siRNA est capable d'inhiber à la fois la formation d'une tumeur primaire mais aussi la dissémination métastatique dans un modèle de tumorigenèse chez le poulet, suggérant que la surexpression de la Nétrine-1 est un facteur de survie des cellules tumorales, et qu'elle favorise également l'échappement métastatique (Delloye-Bourgeois et al., 2009a). En effet, il a été montré que la greffe de cellules de neuroblastomes exprimant fortement la Nétrine-1 (lignée IMR32) sur la membrane chorio-allantoïdienne d'embryons de poulet induisait la formation d'une tumeur primaire sur la membrane mais aussi une dissémination métastatique dans le foie et le poumon de l'embryon, phénomènes tous deux inhibés par l'injection intratumorale ou intraveineuse du peptide DCC-5Fbn ou d'un siRNA Nétrine-1 respectivement (Delloye-Bourgeois et al., 2009b). Un autre groupe a également montré que la Nétrine-1 était surexprimée dans des lignées de mélanomes en comparaison avec des mélanocytes (non-tumoral) et que cette surexpression de la Nétrine-1 par les cellules de mélanomes était associée à un pouvoir migratoire accru des cellules exprimant fortement la Nétrine-1. Toutefois, dans cette étude aucune donnée clinique ne permet de corréler la surexpression de la Nétrine-1 dans les mélanomes avec leur capacité à former des métastases (Kaufmann et al., 2009).

D'autre part, la surexpression de Nétrine-1 a été caractérisée comme un facteur de mauvais pronostic dans les cancers pancréatiques et les neuroblastomes métastatiques de stade IV. En effet, les patients présentant des adénocarcinomes pancréatiques avec un taux d'expression faible ou nul de la Nétrine-1 présentent une espérance de vie sans rechute accrue (supérieur ou égale à 11 mois) en comparaison des patients présentant une surexpression de Nétrine-1 pour lesquels l'espérance de vie sans rechute est de 4 mois. Cette étude révèle également que les cancers présentant une surexpression de la Nétrine-1 sont plus disséminés

et peu différenciés en comparaison avec les cancers exprimant peu ou pas la Nétrine-1 (Link et al., 2007).

Les neuroblastomes de stade IV peuvent être subdivisés en 3 classes distinctes : (i) les neuroblastomes se déclarant chez les enfants de moins d'1 an, (ii) les neuroblastomes se déclarant chez des enfants de moins d'1an et régressant spontanément (stade 4S) et enfin (iii), les neuroblastomes se déclarant chez les enfants de plus d'1 an. Les deux premiers types de neuroblastomes sont considérés comme de bon pronostic car ils répondent aux traitements chimiothérapeutiques ou régressent spontanément et les enfants atteints présentent un taux de survie à 5 ans supérieur à 80%. Au contraire, le dernier type de neuroblastome évoqué est de très mauvais pronostic car il répond très mal aux chimiothérapies et présente un taux de survie à 5 ans de 30% seulement. De manière intéressante, l'analyse de l'expression de la Nétrine-1 révèle qu'environ 40% de ces neuroblastomes de mauvais pronostic présentent une surexpression de Nétrine-1 contrairement aux neuroblastomes de stade 4 de bon pronostic (Delloye-Bourgeois et al., 2009b).

En résumé, la surexpression de la Nétrine-1 est associée avec des stades cancéreux agressifs, caractérisés par une migration des cellules tumorales dans les tissus adjacents (ganglions) ou distants (métastases) de la tumeur. De plus, des études *in vitro* et *in vivo* ont permis de mettre en évidence que cette surexpression de Nétrine-1 avait un rôle de facteur de survie des cellules tumorales capable par ailleurs de stimuler leur migration et leur dissémination dans les ganglions ou dans des sites métastatiques secondaires.

Chapitre III : Objectifs de thèse

Le laboratoire s'intéresse à la signalisation des récepteurs à dépendance et à leurs dérégulations pathologiques dans les cancers ou dans la maladie neurodégénérative d'Alzheimer. Je fais partie d'une équipe dont le but est de caractériser d'une part le rôle de la Nétrine-1 et de ses récepteurs UNC5H et DCC dans le contrôle de la tumorigenèse, et d'autre part la signalisation pro-apoptotique médiée par ces récepteurs.

Les premières études menées par ce groupe ont permis de caractériser le rôle de suppresseur de tumeur des récepteurs UNC5H3 et DCC dans le colon et de montrer que la surexpression de la Nétrine-1 était une étape suffisante à l'initiation de la tumorigenèse intestinale (Bernet et al., 2007; Mazelin et al., 2004). Au cours de ma thèse, j'ai participé à la caractérisation de la perte de fonction apoptotique des récepteurs UNC5H par surexpression de la Nétrine-1 dans d'autres cancers : la tumorigenèse pulmonaire et mammaire (publication de deux articles en co-auteur et un article en préparation en co-premier auteur). Au laboratoire, une thérapie ciblée dirigée spécifiquement contre la surexpression de Nétrine-1 dans les cancers est en cours de développement.

En parallèle, j'ai également étudié la signalisation des récepteurs à dépendance UNC5H et DCC. En effet, j'ai participé à la mise en évidence de l'oligomérisation des récepteurs UNC5H2 et DCC en présence de Nétrine-1 à l'origine de l'inhibition de leurs voies de signalisation apoptotique respectives (publication d'un article en co-auteur) et d'autre part, j'ai réalisé un crible d'ARNinterférence afin d'identifier de nouveaux effecteurs des voies de signalisation des récepteurs UNC5H qui m'a permis de caractériser le rôle de la protéine phosphatase PP2A et plus particulièrement de sa sous-unité PR65β dans la déphosphorylation de la DAPk et l'induction de l'apoptose par le récepteur UNC5H2 (article en premier auteur actuellement soumis).

Résultats

Partie I : Caractérisation de la Nétrine-1 et de ses récepteurs UNC5H dans la tumorigenèse mammaire et pulmonaire et élaboration d'une thérapie ciblée

Après une présentation des travaux visant à caractériser le rôle de la Nétrine-1 dans la tumorigenèse mammaire et pulmonaire, j'exposerai comment la Nétrine-1 pourrait être ciblée afin de développer une nouvelle thérapie. L'ensemble des travaux sera exposé sous une forme résumée avec les publications ou les résultats correspondants joints.

Article 1 : L'expression de la Nétrine-1 est un avantage sélectif pour la survie des cellules tumorales dans les cancers du sein métastatiques

Netrin-1 expression confers a selective advantage for tumor cell survival in metastatic breast cancer.

Fitamant J., Guenebeaud C., Coissieux MM., Guix C., Treilleux I., Scoazec JY., Bachelot T., Bernet A., Mehlen P. PNAS, 2008

Afin d'évaluer le rôle de la Nétrine-1 et de ses récepteurs dans la tumorigenèse mammaire, nous avons dans un premier temps analysé le taux d'expression de la Nétrine-1 par RT-PCR-Quantitative à partir d'un panel de 51 échantillons de tumeurs mammaires. Ces biospies tumorales étudiées regroupent 3 types de tumeurs : des tumeurs localisées non-métastatiques (N0, n=16), des tumeurs associées à un envahissement ganglionnaire (N+M0, n=19) et enfin des tumeurs métastatiques d'emblée (M+, n=16), c'est-à-dire prélevées chez des patientes présentant des foyers métastatiques dans divers organes dès le diagnostique de la tumeur primaire. Une surexpression de Nétrine-1 proportionnelle à l'aggressivité tumorale a ainsi pu être mise en évidence. En effet, 31.5% des tumeurs N+M0 présentent une expression de *nétrine-1* 5 fois supérieures à celle observée pour les tumeurs N0, cette proportion atteignant 62.5% pour les tumeurs métastatiques M+. Parmi ces dernières, 37.5% présentent une surexpression de Nétrine-1 de plus de 15 fois supérieure à la population N0, une telle surexpression n'ayant été retrouvée pour aucune tumeur des deux groupes N0 et N+M0. Par ailleurs, des immunohistochimies réalisées sur des coupes de tumeurs primaires ont confirmé que la Nétrine-1 était largement surexprimée dans les tumeurs M+ par rapport

aux tumeurs N+M0. En revanche, aucune différence significative n'a été détectée dans l'expression des récepteurs UNC5H1-3 dans les échantillons tumoraux par rapport aux échantillons de tissus sains associés. L'expression du récepteur DCC est quant à elle perdue dans les trois populations tumorales analysées.

Afin d'étudier le rôle de cette surexpression de Nétrine-1 dans l'échappement métastatique, nous avons utilisé un modèle murin de tumorigenèse mammaire comportant deux lignées tumorales 67NR et 4T1 dérivées d'une même tumeur mammaire de souris Balb/C. Malgré leur origine et leur capacité commune à former des tumeurs primaires mammaires chez la souris Balb/C, seule la lignée 4T1 est capable d'accomplir toutes les étapes du processus métastatique, et de disséminer dans les mêmes organes que ceux affectés en cas de cancer du sein chez la femme : l'os, le poumon, le foie et le cerveau. De manière intéressante, nous avons retrouvé dans ce modèle la différence d'expression observée chez l'homme : la lignée métastatique 4T1 exprime la Nétrine-1 au contraire de la lignée 67NR, expression associée à une production autocrine de la protéine. Par ailleurs, nous avons montré que la Nétrine-1 produite de manière autocrine était un facteur de survie pour les cellules 4T1 *in vitro* car son inhibition par siRNA ou par un peptide titrant la Nétrine-1 induit l'apoptose de ces cellules en culture, cet agent titrant correspondant à l'un des sites de fixation de la Nétrine-1 sur le récepteur DCC (5ème domaine fibronectine de DCC d'où son nom : DCC-5Fbn). De plus, nous avons montré que l'apoptose des cellules 4T1 induite par la privation de la Nétrine-1 était liée à l'activation des voies de signalisation pro-apoptotiques par les récepteurs UNC5H. En effet, la transfection du mutant dominant négatif UNC5H2-IC-D412N (inhibiteur de la signalisation apoptotique de l'ensemble des récepteurs UNC5H), bloque l'apoptose des cellules 4T1 induite par la privation de Nétrine-1.

En parallèle, nous avons également analysé l'expression de la Nétrine-1 et son rôle de facteur de survie dans les lignées tumorales mammaires humaines. Pour cela, nous avons analysé l'expression de la Nétrine-1 (par RT-PCR quantitative) dans 48 lignées tumorales humaines et nous avons sélectionné les lignées SKBR7 et T47D comme des lignées exprimant fortement la Nétrine-1 au contraire de la lignée MDA-MB231. Nous avons montré que l'inhibition de la Nétrine-1 (par siRNA ou par le peptide bloquant DCC-5Fbn) induisait spécifiquement l'apoptose des cellules exprimant la Nétrine-1 suggérant que le rôle de facteur de survie de la Nétrine-1 est conservé chez l'homme tout comme la production autocrine de Nétrine-1 par les cellules tumorales.

Nous avons ensuite voulu vérifier que la production autocrine de la Nétrine-1 constituait bien un avantage sélectif de survie favorisant la prolifération des cellules

tumorales *in vivo* et leur dissémination métastatique. Pour cela, nous avons réalisé des clones stables de la lignée 4T1 exprimant le gène de la luciférase *firefly* permettant le suivi visuel et quantitatif de la progression tumorale *in vivo* par un processus non-invasif utilisant la bioluminescence. Nous avons injecté les cellules 4T1 par voie intraveineuse à des souris Balb/C, condition selon laquelle les cellules 4T1 colonisent rapidement les poumons et forment des métastases en deux semaines. Ce modèle a permis de démontrer l'efficacité du peptide DCC-5Fbn ou bien du siRNA anti-Nétrine-1 sur la dissémination métastatique des cellules 4T1 et sur la régression des foyers métastatiques formés par les cellules 4T1. En effet, il a été montré que l'administration quotidienne du peptide DCC-5Fbn par voie intrapéritonéale inhibait de manière dose dépendante la formation de foyers tumoraux secondaires en comparaison avec l'injection d'un peptide contrôle FADD (produit dans les mêmes conditions que le peptide DCC-5Fbn), des résultats similaires ayant été obtenus avec l'injection du siRNA Nétrine-1 en comparaison avec un siRNA contrôle. D'autre part, il a été montré que l'inhibition de la Nétrine-1 par le peptide DCC-5Fbn était non seulement capable d'éviter la formation de métastases mais également d'induire une régression des foyers secondaires déjà en place. Pour cette deuxième étude, le début du traitement des souris a été différé au moment où des foyers micrométastatiques pulmonaires sont détectables chez les souris.

En conclusion, cette étude montre que la surexpression de la Nétrine-1 peut être considérée comme un marqueur de la dissémination métastatique chez les patientes atteintes d'un cancer du sein, que cette expression semble correspondre à un avantage sélectif acquis par les cellules tumorales pour s'affranchir de la dépendance induite par l'expression de leurs récepteurs UNC5H (seuls récepteurs à dépendance à Nétrine-1 exprimés dans l'ensemble des cellules utilisées) et que cette caractéristique permet d'envisager une nouvelle approche thérapeutique ciblée basée sur l'inhibition de la Nétrine-1 afin de rétablir l'activité pro-apoptotique de ses récepteurs et d'induire la mort des cellules tumorales, cette approche ayant été validée chez un modèle syngénique murin de cancer du sein.

Netrin-1 expression confers a selective advantage for tumor cell survival in metastatic breast cancer

Julien Fitamant*, Céline Guenebeaud*, Marie-May Coissieux*, Catherine Guix*, Isabelle Treilleux†, Jean-Yves Scoazec‡, Thomas Bachelot†, Agnès Bernet*, and Patrick Mehlen*§

*Apoptosis, Cancer, and Development Laboratory–Equipe Labellisée ''La Ligue,'' Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche 5238, and †Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U590, Centre Léon Bérard, Université de Lyon 69008 Lyon, France; and ‡Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U865 and Plate-forme d'Histopathologie du Petit Animal IFR62, Faculté Laennec, Université Claude Bernard, 69437 Lyon, France

Edited by Bert Vogelstein, The Sidney Kimmel Comprehensive Cancer Center at Johns Hopkins, Baltimore, MD, and approved January 15, 2008 (received for review October 15, 2007)

Netrin-1, an axon navigation cue was proposed to play a crucial role during colorectal tumorigenesis by regulating apoptosis. The netrin-1 receptors DCC and UNC5H were shown to belong to the family of dependence receptors that share the ability to induce apoptosis in the absence of their ligands. Such a trait confers on these receptors a tumor suppressor activity. Expression of one of these dependence receptors at the surface of a tumor cell is indeed speculated to render this cell dependent on ligand availability for its survival, hence inhibiting uncontrolled cell proliferation or metastasis. Consequently, it is a selective advantage for a tumor cell to lose this dependence receptor activity, as previously described with losses of DCC and UNC5H expression in human cancers. However, the model predicts that a similar advantage may be obtained by gaining autocrine expression of the ligand. We describe here that, unlike human nonmetastatic breast tumors, a large fraction of metastatic breast cancers overexpress netrin-1. Moreover, we show that netrin-1-expressing mammary metastatic tumor cell lines undergo apoptosis when netrin-1 expression is experimentally decreased or when decoy soluble receptor ectodomains are added. Such treatments prevent metastasis formation both in a syngenic mouse model of lung colonization of a mammary cancer cell line and in a model of spontaneous lung metastasis of xenografted human breast tumor. Thus, netrin-1 expression observed in a large fraction of human metastatic breast tumors confers a selective advantage for tumor cell survival and potentially represents a promising target for alternative anticancer therapeutic strategies.

apoptosis | DCC | dependence receptor

Netrin-1, a diffusible laminin-related protein, has been shown to play a major role in the control of neuronal navigation during the development of the nervous system by interacting with its main receptors, DCC (Deleted in Colorectal Cancer) (1–3) and UNC5H (4, 5). However, more recently, netrin-1 has emerged as a completely different molecule that regulates cell survival. Indeed, the netrin-1 receptors DCC and UNC5H, i.e., UNC5H1, UNC5H2, and UNC5H3, belong to the so-called dependence receptor family (6, 7). Such receptors share the functional property of inducing cell death when disengaged from their ligands, whereas the presence of their ligands blocks this proapoptotic activity. Such receptors thus create cellular states of dependence on their respective ligands (8, 9).

This dependence effect has been suggested to act as a mechanism for eliminating tumor cells that would develop in settings of ligand unavailability: proliferation of tumor cells in a cell environment with constant and limited ligand presence or migration of metastatic tumor cells toward tissues where the ligand is not expressed. A selective advantage for a tumor cell would then be to lose the proapoptotic activity of its dependence receptors. Along this line, *DCC* was proposed in the early 1990s to be a tumor-suppressor gene, whose expression is lost in the vast majority of human cancers (10, 11). This hypothesis also fits with the observation that *UNC5H* genes are down-regulated in the vast majority of colorectal tumors, hence suggesting that the loss of *UNC5H* genes represents a selective advantage for tumor development (12–14). Interestingly, in mice, both inactivation of *UNC5H3* and overexpression of *netrin-1* in the gastrointestinal tract are associated with intestinal tumor progression (13, 15), hence demonstrating *per se* that loss of netrin-1 dependence receptors in the human pathology is a causal factor for tumor progression (16).

However, the model described above predicts that not only loss of netrin-1 receptors but also gain of ligand expression, i.e., autocrine expression, should be observed in human cancers, because they should represent similar selective advantages for tumor progression. This question is important not only for basic knowledge but also for putative therapy: Indeed, triggering tumor-cell death by inhibiting the extracellular interaction between netrin-1/receptors could represent an appealing anticancer strategy. We show here that the majority of breast tumors with metastatic propensity show increased netrin-1 expression, a feature that we used in different mouse models to prevent/inhibit metastatic development.

Results

Netrin-1 Is a Marker for Human Metastatic Breast Cancer. We first analyzed by quantitative (Q)RT-PCR, expression of netrin-1, its dependence receptors, i.e., DCC, UNC5H2, and UNC5H3, and, as positive control, a known marker of metastasis, CXCR4 (17) in a panel of 51 breast primary tumors. These tumors were from lymph node-negative patients (*N*0, 16 patients), lymph node-positive patients (*N* + M0, 19 patients) or metastatic patients at the time of diagnosis (M+, 16 patients). As already described, CXCR4 is significantly more expressed in *N* + M0 or M+ primary tumors compared with N0 tumors [supporting information (SI) Fig. 5*A* in *SI Appendix*]. Although DCC was barely detectable and UNC5H expression failed to display significant changes between the different types of tumors (data not shown, Fig. 1*A* and SI Fig. 5*B* in *SI Appendix*), netrin-1 is significantly more expressed in *N* + M0 tumors than in N0 tumors (median, 1.8 versus 0.5; $P = 0.007$) with a range of netrin-1 expression higher in *N* + M0 tumors (Fig. 1*A* and SI Fig. 5*B* in *SI Appendix*). Whereas 31.5% of the *N* + M0 tumors show at least a 5-fold increase in netrin-1, no such increase was detected in any tested N0 tumors (Fig. 1*A* and SI Fig. 5*B* in *SI Appendix*). An even more striking difference is observed when comparing netrin-1 expression in M+ versus N0 tumors (median,

Author contributions: A.B. and P.M. contributed equally to this work; J.F., A.B., and P.M. designed research; J.F., C. Guenebeaud, M.-M.C., C. Guix, I.T., J.-Y.S., and A.B. performed research; I.T. and T.B. contributed new reagents/analytic tools; J.F., I.T., J.-Y.S., T.B., A.B., and P.M. analyzed data; and P.M. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

This article is a PNAS Direct Submission.

§To whom correspondence should be addressed. E-mail: mehlen@lyon.fnclcc.fr.

This article contains supporting information online at www.pnas.org/cgi/content/full/0709810105/DC1.

© 2008 by The National Academy of Sciences of the USA

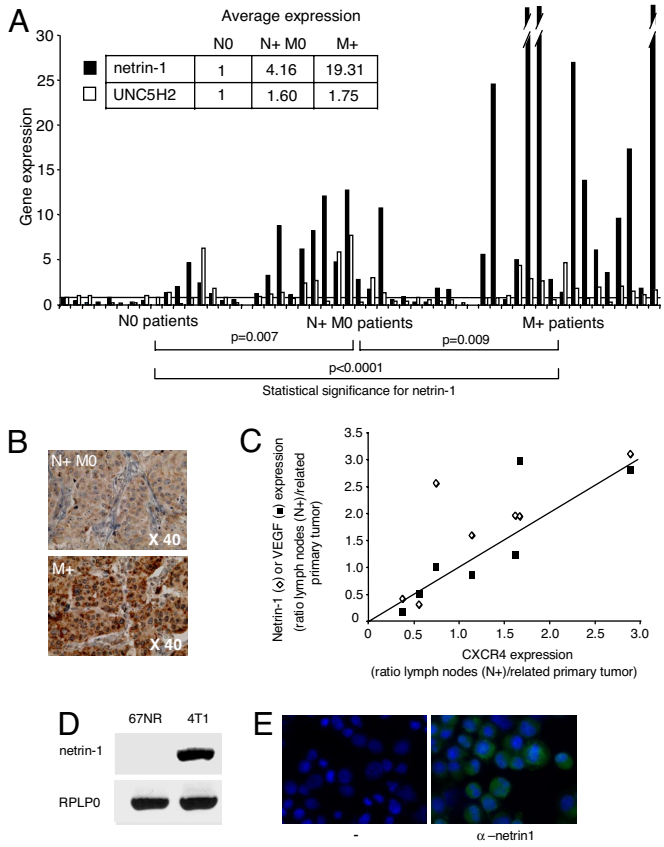


Fig. 1. Netrin-1 is overexpressed in metastatic breast tumors. (*A*) Expression profile of netrin-1 and UNC5H2 examined with quantitative real-time RT-PCR. QRT-PCR was performed by using total RNA extracted from 51 tumor biopsies. They were obtained from patients with tumors localized to the breast (N0), with only axillary node involvement ($N+$ M0), and with distant metastases at diagnosis (M+). Specific human netrin-1 primers (35) and primers corresponding to the human *HMBS* gene (hydroxymethylbilane synthase) were used. *HMBS* was used as a reference here because it shows a weak variability at the mRNA level between normal and breast tumoral tissues, as described (36). Another reference TBP was also used with similar results (data not shown). Netrin-1 expression is given as the ratio between netrin-1 expression in each sample and the average of netrin-1 expression in the N0 samples, shown by a horizontal bar. UNC5H2 expression is also given as the ratio between UNC5H2 expression in each sample and the average of UNC5H2 level in N0 samples. Nonparametric statistical significance tests (Mann–Whitney) were used; the *P* values for netrin-1 are indicated. The average of netrin-1 and UNC5H2 expression is indicated for each tumor stage (upper left). (*B*) Representative netrin-1 immunohistochemistries on sections from two human tumors presented in *A*. Enlargement is indicated. (*C*) Comparison between netrin-1 or VEGFR expression and CXCR4 expression in seven pairs of frozen human invaded lymph nodes/primary tumors. Ratio between the mRNA level measured by QRT-PCR in invaded lymph node to the one detected in the primary tumor is shown for each pair and is represented as the ratio of netrin-1 (VEGFR) to CXCR4. (*D*) cDNA amplification from 67NR or 4T1 cells loaded in an agarose gel. (*E*) Immunostaining on 4T1 cell line using netrin-1 antibody. A control without the primary antibody is indicated. Nuclei were visualized with Hoescht staining.

7.8 versus 0.5; $P < 0.0001$). Along this line, 62.5% of M+ tumors show at least a 5-fold increase in netrin-1 expression. A significant difference in netrin-1 expression also exists between $N+$ M0 and M+ tumors (median, 1.8 versus 7.8; $P = 0.009$). Moreover, netrin-1 overexpression is higher in M+ tumors than in $N+$ M0 tumors, because 37.5% of M+ tumors display a >15-fold increase in netrin-1 levels, whereas such an increase is not detected in $N+$ M0 tumors (Fig. 1*A* and SI Fig. 5*B* in *SI Appendix*). Interestingly, although netrin-1 is commonly spotted in the commercially available DNA microarrays, netrin-1 was not found associated with breast metastatic cancer in the different profiling experiments reported so far [(18), see www.oncomine.org]. Netrin-1 was, in most cases, detected only at background level, but, as shown in SI Fig. 5*C* in *SI Appendix*, this is probably due to a bias within the cDNA amplification procedure used in the profiling experiments. Immunohistochemistry performed on a panel of $N+$ M0 or M+ breast primary tumors sections revealed netrin-1 protein expression (Fig. 1*B* and SI Fig. 5*D* in *SI Appendix*). To further analyze whether the high netrin-1 expression observed in $N+$ M0 or M+ primary tumors is also observed in disseminating tumors cells, we next measured netrin-1 mRNA level in pairs including both the primary tumors and the related metastatic lymph nodes. The expression ratio between lymph nodes and primary tumors is higher for netrin-1 than for the other known genes involved in the metastatic process, i.e., CXCR4 and VEGFR, (Fig. 1*C*, six of seven pairs tested). Thus, netrin-1 up-regulation appears as a marker of lymph node involvement and distant metastatic disease in human breast cancer.

Table 1. Expression of netrin-1 examined by QRT-PCR using total RNA extracted from 48 human breast and 2 mouse mammary cell lines

Cell line	netrin-1	Cell line	netrin-1
Human		Human	
184-A1	+	MDAMB 185	+++
184-B5	++	MDAMB 231	–
BR-CA-MZ-01	++	MDAMB 361	++
BR-CA-MZ-02	+	MDAMB 415	+
BT-20	++	MDAMB 435S	–
BT-474	+++	MDAMB 436	+++
BT-549	++	MDAMB 453	–
BY-549	++	MDAMB 468	++
CAMA-1	++	S 68	++
HBL-100	++	SKBR3	+++
HCC38	–	SKBR7	+++++
HCC202	+++	SUM 52	++
HCC1395	+	SUM 102	++
HCC1500	++++	SUM 149	–
HCC1569	++	SUM 159	–
HCC1806	+	SUM 185	+++
HCC1937	++	SUM 190	++++
HCC1954	++	SUM 206	++
HCC2218	++	SUm 225	–
HME-1	++	SUM 229	–
Hs 578T	+	T47D	++++
MCF7	++	UACC812	++
MCF-10A	–	ZR751	–
MCF-10F	–	Mouse	–
MDAMB 134	+	67NR	+++++
		4T1	

Netrin-1 expression was analyzed compared with the housekeeping genes *HMBS* (Hydroxymethylbilane synthase) or *RPLP0* expression in each sample. TBP was also used as a control here and gave similar results (data not shown). A range of netrin-1 expression is shown from +++++ (high) to – (barely detectable).

Disruption of the Netrin-1 Autocrine Loop Triggers Cancer Cell Death. Because netrin-1 appears to be up-regulated in a large fraction of aggressive human breast cancers, we next investigated whether netrin-1 is also expressed in a panel of 50 breast cell lines. Interestingly netrin-1 is highly expressed in a sizeable fraction of human breast cancer cell lines (Table 1) and all cell lines showing high netrin-1 levels (greater than +++) have been derived from aggressive tumors or/and have been shown to form metastases in mice. We also studied two mouse cell lines, 4T1 and 67NR (Table 1 and Fig. 1*D*), developed by Miller and colleagues (19) as cell lines, derived from a BALB/c mouse spontaneous primary mammary

MEDICAL SCIENCES

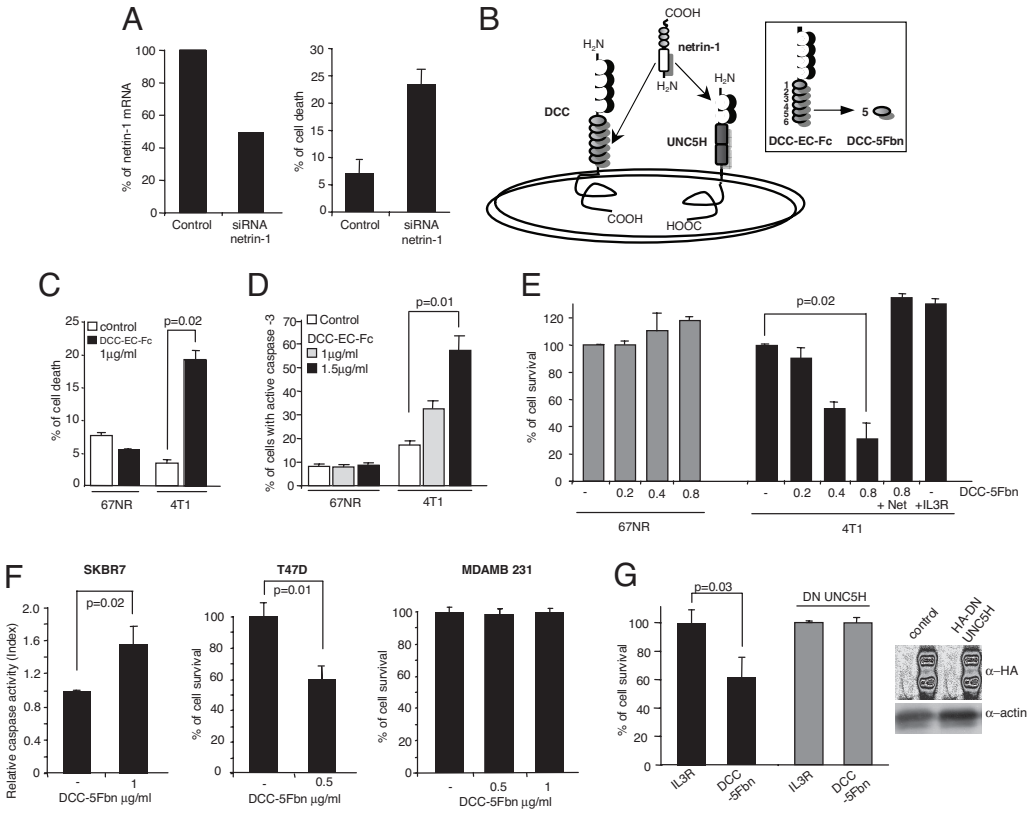


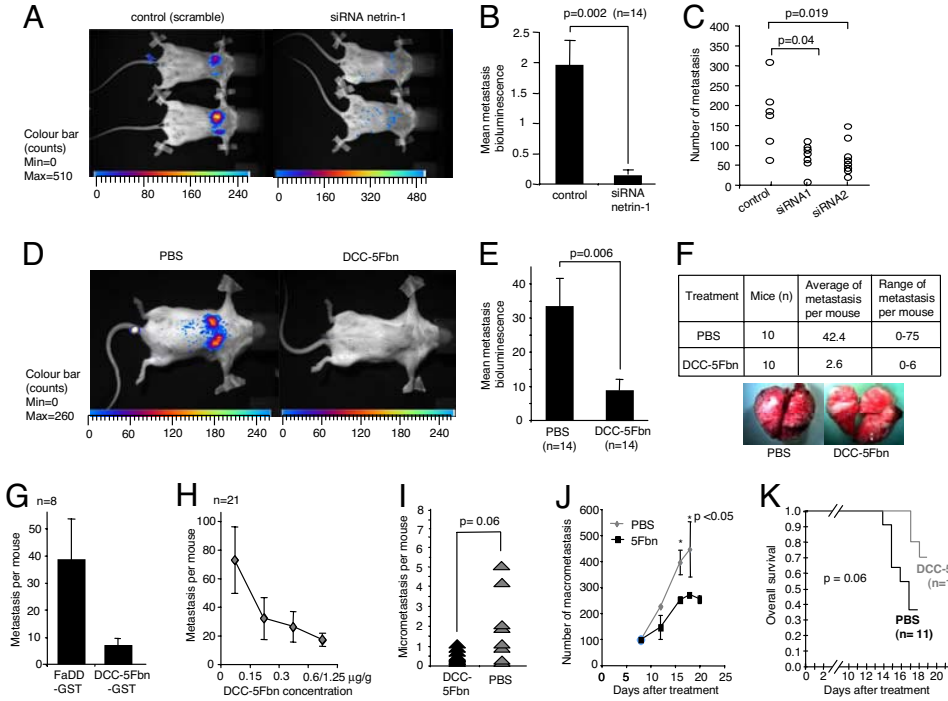
Fig. 2. Induction of metastatic cell death by inhibiting the netrin-1 autocrine loop. (*A*) Induction of 4T1 cell death by reducing netrin-1 level. The 4T1 cells were treated with scramble siRNA (control) or netrin-1 siRNA. Twenty-four hours later, the netrin-1 mRNA level was quantified by QRT-PCR (*Left*), and cell death was determined 1 day later by trypan blue-exclusion assay (*Right*). (*B*) Scheme representing netrin-1 and its receptors, DCC and UNC5H. (*Inset*) The extracellular part of the DCC receptor (DCC-EC-Fc) and the fifth fibronectin type III domain of DCC (DCC-5Fbn) used to induce cell death. (*C–E*) Quantitative analysis of cell death in 67NR and 4T1 cells treated with DCC-EC-Fc (*C* and *D*), with DCC-5Fbn (*E*) or with an unrelated soluble protein IL3R-EC-Fc. Cell death/survival was quantified by the trypan blue-exclusion assay (*C*), by caspase activity measurement by flow cytometry (*D*), or by MTT assay (*E*). In this latter test, netrin-1 was added in excess to reverse the effect of DCC-5Fbn. (*F*) Cell-death induction by DCC-5Fbn in SKBR7 and T47D cell lines but not in MDAMB231 cells. Cell survival was quantified by MTT assay (*Right*), and apoptosis was measured by caspase activity assay (*Left*). (*G*) Quantitative analysis of cell survival by MTT assay in the presence of either IL3R-Fc or DCC-5Fbn in 4T1 cells or 4T1 cells stably transfected with UNC5H2-IC D412N (DN UNC5H; i.e., the intracellular domain of UNC5H2 mutated in the caspase site acts as a dominant negative for UNC5H proapoptotic activity (SI Fig. 7*D* in *SI Appendix*). (*Inset*) Western blot using an anti-HA-UNC5H2 antibody was performed on the mock-transfected and DN UNC5H-expressing 4T1 cell lines. Standard deviations are indicated ($n > 3$). In *C–G*, Mann–Whitney tests were performed, and a *P* value is indicated.

tumor, showing different metastatic potentials when injected into syngenic mice. Although 67NR cells form primary mammary tumors but no metastasis, 4T1 cells form primary tumors and metastasis, especially in the lung, the liver, and the bone marrow. Interestingly, although netrin-1 receptors (i.e., DCC, UNC5H1, UNC5H2, and UNC5H3) failed to show significant difference between 67NR and 4T1 cell lines, netrin-1 mRNA was hardly detected in 67NR cells, whereas it was expressed in 4T1 cells (Fig. 1D*E* and SI Fig. 6*A* in *SI Appendix*). This presence of the netrin-1 mRNA in 4T1 cells is associated with the detection of netrin-1 protein after netrin-1 immunostaining performed in the absence of cell permeabilization (Fig. 1*E*). Therefore, metastatic 4T1 cells show autocrine production of netrin-1.

We next investigated whether this netrin-1 autocrine production confers a selective advantage to 4T1 cells by inhibiting DCC/UNC5H-induced cell death. We first down-regulated expression of netrin-1 in 4T1 cells using RNAi strategy. As shown in Fig. 2*A*, down-regulation of netrin-1 in 4T1 cells was associated with cell-death induction monitored by a trypan blue-exclusion assay. As a second approach, we looked for a compound that may inhibit the interaction between netrin-1 and its receptors. It was reported that a domain located in the N terminus of netrin-1 (the so-called laminin-VI domain) interacts with both DCC and UNC5H receptors [Fig. 2*B*; (20)]. We show that a soluble extracellular domain of DCC (DCC-EC-Fc) is able to inhibit both DCC/netrin-1 and UNC5H2/netrin-1 interaction, as measured by ELISA (SI Fig. 7*A* in *SI Appendix*). This soluble ectodomain is also able to inhibit netrin-1-induced DCC-mediated signaling pathways [e.g., MAPK activation (3)] (SI Fig. 7*B* in *SI Appendix*). DCC-EC-Fc was then added to a 4T1 cells culture—or as a control 67NR cells culture—and cell death/survival was monitored, either by a trypan blue-exclusion assay (Fig. 2*C*) or by a MTT assay (data not shown). In addition, apoptosis was more specifically monitored by measuring caspase activity (Fig. 2*D*). As shown in Fig. 2 *C* and *D*, addition of the competing soluble protein in the culture medium triggers death of 4T1 cells, whereas it has no effect on 67NR cell death.

Because the complete extracellular domain of DCC appears as only of modest interest for use *in vivo* and in therapy (DCC-EC-Fc is ≈1,100 aa large), we looked for an alternative polypeptide from the DCC extracellular domain that could trigger apoptosis in 4T1 cells but not in 67NR cells. We consequently produced a flag-tagged fifth fibronectin type III domain of DCC, DCC-5Fbn, a domain located in the ectodomain of DCC that is known to interact with netrin-1 (20) (Fig. 2*B Inset*). This 100-aa protein does not interfere with the binding of DCC/netrin-1 or UNC5H/netrin-1 but affects the ability of netrin-1 to trigger multimerization of these receptors, a multimerization required for the inhibitory activity of netrin-1 on DCC- or UNC5H-induced cell death (F. Mille, F. Llambi, C. Guix, C. Thibert, J.F., C. Guenebeaud, S. Castro-Obregon, D. E. Bredesen, and P.M., unpublished work). As shown in Fig. 2*E*, addition of DCC-5Fbn triggers, in a dose-dependent manner, death of 4T1 cells as measured by MTT assay. Similar results were obtained by using trypan blue-exclusion or caspase-activity assays (data not shown). This cell-death effect is directly associated with netrin-1 autocrine expression because (*i*) DCC-5Fbn has no effect on 67NR cells, (*ii*) addition of an excess netrin-1 blocks the death effect of DCC-5Fbn, and (*iii*) IL3R-EC-Fc (the extracellular domain of the IL3 receptor) fails to trigger 4T1 cell death (Fig. 2*E*).

The acquired survival advantage through netrin-1 autocrine expression is not restricted to murine tumor cells, because it is detected in human breast cancer cell lines. Indeed, addition of



Treatment	Mice (n)	Average of metastasis per mouse	Range of metastasis per mouse
PBS	10	42.4	0-75
DCC-5Fbn	10	2.6	0-6

Fig. 3. Inhibition of metastasis formation in mice by disruption of the netrin-1 autocrine loop. The 4T1-luc cells were i.v. injected into BALB/c mice at day 0. (*A–C*) Scramble siRNA or netrin-1 siRNA was i.v. injected daily, and after 9 (*A* and *B*) or 14 (*C*) days, lung metastasis was studied by luminescence recording (*A* and *B*) or by examination of lungs under a microscope (*C*). (*A*) A representative image of luminescence recording of scramble siRNA- (*Left*) or netrin-1 siRNA- (*Right*) treated mice. (*B*) Quantification of the luminescent signal measured by the NightOwLB II system. A luminescent signal for each group (control vs. netrin-1 siRNA) is given as a mean of the different ratios between summed luminescent signal in the lung area (photons/sec) and a background area defined in the animal body. Number of mice is indicated ($n = 14$). (*C*) Number of lung metastatic nodules in individual mice were counted after day 14 under a dissection microscope in three treated populations [scramble (control), first set of siRNA also used in *A* and *B*, and second set of siRNA]. (*D–F*) As in *A–C* except than PBS or DCC-5Fbn were injected once daily i.v. or once i.p. starting at day 0. After 13 days, metastasis development was studied by luminescence recording (*D* and *E*) or by examination of lungs under a microscope (*F*). (*F*) A representative macroscopic photograph of lungs from PBS- (*Left*) or DCC-5Fbn- (*Right*) treated mice (*Lower*). Total number of lung metastatic nodules in individual mice were counted in the two treated populations (+PBS, +DCC-5Fbn) (*Upper*). (*G*) As in *F* except that GST-DCC-5Fbn (instead of Flag-DCC-5Fbn) or an unrelated protein GST-FaDD was injected daily. (*H*) Dose effect of DCC-5Fbn. As in *F* except that different concentrations of DCC-5Fbn were injected daily; $n = 21$. (*I*) The 4T1 cells (1×10^3) were i.v. injected at day 0. At day 7 (at this day from one to eight micrometastasis are visible, data not shown), the mice were treated daily with PBS or DCC-5Fbn, and enumeration of metastasis was performed at day 11. (*J*) The 4T1 cells (5×10^5) were i.v. injected at day 0. At day 8, when at least 90 macrometastasis are visible, the mice were treated daily with PBS or DCC-5Fbn, and enumeration of metastasis was performed from day 8 to day 18 for PBS-treated mice, as we were required ethically to euthanize them, to day 20 for DCC-5Fbn-treated mice (each point represents three mice). (*K*) Overall survival of mice, which were i.v. injected with 10^6 4T1 cells, treated daily with PBS (black) or DCC-5Fbn (gray). *P* values were calculated by using the Kaplan–Meier test. Standard deviations are indicated. In *B*, *C*, *E*, *G*, and *I*, Mann–Whitney tests were performed, and a *P* value is indicated.

DCC-5Fbn to naturally netrin-1-expressing human breast adenocarcinoma T47D or SKBR7 cell cultures triggers cell-death induction measured either by caspase-3 activity assay or MTT assay, whereas it had no effect on netrin-1-negative cells like MDAMB-231 (Fig. 2*F*). Similar results were obtained by netrin-1 siRNA approach (SI Fig. 7*C* in *SI Appendix* and data not shown).

This cell-death induction upon inhibition of the netrin-1 autocrine loop, i.e., via inhibition of netrin-1 level, via inhibition of netrin-1/receptors interaction, or via inhibition of netrin-1 receptors multimerization, appears to occur through UNC5H receptors. Indeed, DCC is hardly detected in 4T1, T47D, or SKBR7 cells (SI Fig. 6*A* in *SI Appendix* and data not shown). Moreover, 4T1 cells stably expressing a dominant negative mutant of UNC5H receptors inhibiting UNC5H-induced apoptosis (SI Fig. 7*D* in *SI Appendix*) are no longer sensitive to DCC-5Fbn (Fig. 2*G*).

Disruption of the Netrin-1 Autocrine Loop Prevents Metastasis Formation. We next investigated whether the cell death effect observed *in vitro* may be extended *in vivo*. As a first approach, 4T1 cells stably transfected with a luciferase-based vector (4T1-luc) were i.v. injected into syngenic BALB/c mice. Metastasis formation was then analyzed by using luminescence recording. As shown in Fig. 3, when i.v. injected, 4T1-luc cells efficiently colonize lungs. To first assay the survival role of netrin-1 in promoting 4T1 cell-mediated lung metastasis, netrin-1 was down-regulated *in vivo* by daily i.p. injection of netrin-1 siRNA. I.p. injection allows the detection by QRT-PCR of netrin-1 siRNA molecules in different organs including lungs (SI Fig. 8*A* in *SI Appendix*). As shown in Fig. 3 *A* and *B*, after 9 days of injection, whereas scramble siRNA injected mice showed lung metastasis, netrin-1 siRNA injection is associated with a significant reduction of lung metastasis measured by luminescence recording. Similar results were obtained by direct anatomopathological examination of lungs after 14 days of injection (Fig. 3*C*). To bring the *in vivo* experiment closer to therapeutic relevance, we then performed a similar set of experiments using DCC-5Fbn injection rather than siRNA. Mice were then i.p. and i.v. injected (once i.v., once i.p.) from day 0 to day 13 with either PBS buffer or Flag-tagged-DCC-5Fbn (1.25 μg per gram of body weight per injection). Metastasis formation was again analyzed by using luminescence recording. As shown in Fig. 3 *D* and *E*, although in PBS-treated mice 4T1-luc cells efficiently colonize lungs, mice treated with DCC-5Fbn show a dramatic reduction of lung metastasis. This inhibition of metastasis formation was then confirmed by anatomopathological examination of lungs (data not shown and Fig. 3*F*). Similar results were obtained when we performed daily i.p. injection of GST-tagged-DCC-5Fbn instead of Flag-tagged-DCC-5Fbn and when an unrelated protein (GST-FaDD) was used as a negative control (Fig. 3*G*). A dose-dependence experiment with DCC-5Fbn was then performed, and, as shown in Fig. 3*H*, a 0.15 μg per gram of body weight is sufficient to decrease metastasis formation. To further analyze whether this treatment may not only prevent metastatic formation by triggering tumor-cell death before extravazation but also could erase metastatic lesions already established in the secondary organ, the DCC-5Fbn treatment was administered once micrometastases were detected in the lung. As shown in Fig. 3*I*, DCC-5Fbn treatment was associated with a decrease in metastasis compared with PBS treatment. To address whether DCC-5Fbn treatment could also decrease macrometastasis, DCC-5Fbn was administered once mac-

MEDICAL SCIENCES

rometastases were detected. As shown in Fig. 3*J*, DCC-5Fbn significantly decreases lung macrometastasis. The antimetastatic effect of DCC-5Fbn is, moreover, associated with increased mouse survival as shown in Fig. 3*K*.

As a second approach to evaluate the antimetastatic effect of DCC-5Fbn, we investigated whether spontaneous development of metastases in lung from a primary breast cancer could also be inhibited by DCC-5Fbn. We took advantage of a fresh human breast tumor, which was characterized as expressing a high level of netrin-1, and that, when xenografted in nude mice, was giving rise to spontaneous development of metastases in the lung. Once tumors reached an optimal size after xenograft in nude mice, [i.e., lung colonization was detected at this stage (data not shown)], mice were treated daily with either PBS or DCC-5Fbn. As shown in Fig. 4, DCC-5Fbn treatment is associated with a significant decrease in the number of aggressive metastases in lungs. Interestingly, this reduction in the number of metastases is associated with the detection of metastatic lesions that are much smaller and associated with dense inflammatory reactions (Fig. 4 *A* and *B*), hence further supporting the view that, in mice, the inhibition by DCC-5Fbn of the prosurvival activity conferred by netrin-1 autocrine expression is associated with antimetastatic effect.

Discussion

Here, we show that netrin-1 expression may be considered as a marker of a breast tumor's ability to disseminate. Most of the breast primary tumors with metastasis abilities showed elevated netrin-1 expression. Both the human pathology and tumor cell line data and the mouse models described above support the view that this elevated netrin-1 level is a selective advantage acquired by the cancer cell to escape netrin-1-dependence receptor-induced apoptosis and, consequently, to survive independently of netrin-1 availability. From a mechanistic point of view, in human pathology, this autocrine expression of netrin-1 probably inhibits UNC5H-induced cell death. Along this line, the antimetastatic effect of netrin-1 siRNA in the 4T1 model is inhibited by injection of UNC5H1 and UNC5H2 siRNA (SI Fig. 8*B* in *SI Appendix*). Thus, DCC, which is barely detectable in the different groups (N0, *N* + M0, M+) of breast cancers studied, is probably of relatively modest interest in metastatic breast cancers. Thus, as predicted by the dependence receptor model, we have now shown that a tumor cell can escape receptor dependency in at least three ways. First, expression of the dependence receptor can be down-regulated, as extensively described for DCC and more recently for UNC5H (10, 12–14, 21). Second, the downstream death signaling can be shut down. We have recently shown that UNC5H2 proapoptotic activity relies on the binding of UNC5H2 to the serine/threonine DAPK (22), a protein that was demonstrated to be involved in metastasis regulation and down-regulated in human malignancy (23). Here, we show that a third selective advantage for the tumor cell is the self-production of the dependency ligand. One intriguing question remains as to why breast tumors with metastatic propensity seem to have preferably selected netrin-1 self-production rather than receptor loss, whereas colorectal tumors have mostly selected loss of the receptors rather than gain of netrin-1 expression—indeed, only 7% of colorectal cancers show an increase of netrin-1 expression (13, 15). A possible explanation is that netrin-1 expression not only confers a gain in survival to the disseminating cells, but also possibly a gain in the nonapoptotic/positive signaling of netrin-1 receptors. It is important to note that netrin-1 was originally described as a guidance cue (24), which, even though completely unproven, could play a role in the tropism of metastatic cells. Other proposed roles of netrin-1 include adhesion and morphogenesis regulation (25–27), both mechanisms that may be of importance for metastasis development. Similarly, netrin-1 was recently proposed to play a role during embryonic angiogenesis, and, even though conflicting results have been published (28–32), we cannot, at this stage, rule out the role of netrin-1 as an angiogenic factor that somehow could favor metastasis development at the secondary site. However, the gain of "positive" signaling by netrin-1 autocrine expression is probably not sufficient *per se* to promote metastasis. Indeed, when netrin-1 was forced in the nonmetastatic 67NR cells, we failed to observe any significant increase of lung metastasis after 67NR injection into mammary glands (SI Fig. 6 in *SI Appendix*). Thus, netrin-1 expression in tumor cells is probably not sufficient to enable metastasis formation from the primary site but mainly confers survival to metastatic cells.

These observations not only provide evidence for the importance of ligand/dependence receptor pairs in the regulation of tumor development, but also suggest a putative therapeutic strategy. Indeed, as of today, there is no efficient treatment for patients with metastatic breast cancer, a lack of treatment that leads to the death of 400,000 women worldwide per year (33). Here, we propose that a treatment based on inhibition of the interaction between netrin-1 and its dependence receptors could positively effect a large fraction of the patients suffering from metastatic breast cancer, i.e., patients who would show high netrin-1 expression in primary tumors. Future preclinical and clinical work needs now to demonstrate whether netrin-1 could represent an appealing target in two-thirds of metastatic breast cancers.

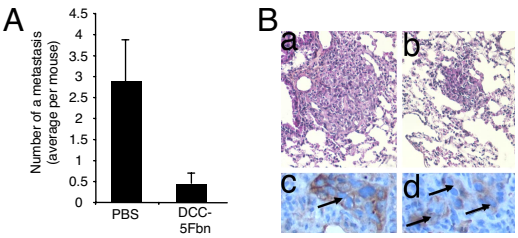


Fig. 4. Disruption of the netrin-1 autocrine loop inhibits spontaneous lung metastasis from a xenografted human breast tumor. (*A*) Antitumor effect of DCC-5Fbn in nude mice xenografted with a fresh human breast tumor. A human breast tumor showing a high netrin-1 level was xenografted into nude mice, and when the tumor reached a palpable size, the mice were i.v. treated daily with PBS or DCC-5Fbn. Metastases were analyzed and enumerated by a pathologist. (*B*) Comparative low-power magnifications of lung metastases in control (*a*) and DCC-5Fbn-treated (*b*) animals; tumor cells, characterized by large size, abundant cytoplasm, and irregular nucleus, are arranged in small masses of variable diameter, scattered within the lung parenchyma. (*c* and *d*) Higher magnifications of lung metastases in a DCC-5Fbn-treated animal. Metastatic cells, revealed by an anti-human cytokeratin 7 antibody, form a small mass surrounded by a dense inflammatory reaction (*c*); at an advanced stage, tumor cells are dissociated by infiltrative inflammatory cells (*d*). (*a* and *b*) H&E staining, original magnifications ×200. (*c* and *d*) Immunoperoxidase, followed by nuclear counterstaining with Mayer's hematoxylin, original magnification ×400.

Methods

A detailed methods section is provided in *SI Materials and Methods* in *SI Appendix*.

Cell Line, Transfection, Immunoblotting, Immunoprecipitation, Plasmid Constructs, siRNA, and Reagents. Human breast and mouse mammary cell lines listed were cultured by using standard procedures and were obtained from D. Birnbaum (Institut National de la Santé et de la Recherche Scientifque U 599, Centre de Recherche, Marseille, France) and F. Miller (Wayne State University, Detroit). Transfection, immunoblotting, and immunoprecipitation were performed as described in *SI Materials and Methods* in *SI Appendix* and essentially as described (22). The different constructs are described in *SI Materials and Methods* in *SI Appendix*. For cell culture use, scramble and netrin-1 siRNAs were designed by Santa Cruz Biotechnology as a pool of three target-specific 20- to 25-nt siRNAs. For the *in vivo* approach, two different single netrin-1, DCC, UNC5H1, or UNC5H2 siRNAs were produced (Sigma–Proligo). DCC-5Fbn was produced upon expression in BL21 lysate and upon affinity chromatography using Flag-Sepharose (Sigma). DCC-EC-Fc was obtained from R & D Systems and Netrin-1, UNC5H2-EC-Fc, GST-DCC-5Fbn, and GST-FaDD from Apotech/Axxora.

Human Breast Tumor Samples, QRT-PCR, and Immunohistology. Fifty-one human breast cancer samples were provided by the tumor bank of the Centre Léon Bérard. Fresh tissue of the tumor was obtained during breast surgery before any systemic therapy and snap-frozen in liquid nitrogen. QRT-PCR was performed as described in *SI Materials and Methods* in *SI Appendix* and essentially as described (13). The sequences of the primers used are available upon request. Paraffin-embedded tumors tissues fixed in formalin were used for analysis. The pathologist selected representative areas from breast carcinomas (N + M0, M+) or liver or uterine metastases. Immunostaining was performed as described in *SI Materials and Methods* in *SI Appendix* and essentially as described (13).

Cell Death Assays. The different cell death assays (trypan blue exclusion, MTT, caspase-3 activity assay) were performed as described in the supplementary materials and essentially as described (22, 34).

Tumor Mouse Models. A complete description of the mouse models is provided in *SI Materials and Methods* in *SI Appendix*. Briefly, for mammary gland injection of 67NR cells, 10^6cells were injected. For i.v. injection, 10^5 (unless indicated) 4T1-luc cells were injected into a tail vein, and mice were either killed or analyzed by using luminescence recording. Lungs were removed, and metastatic nodules were counted and histological classification and grading of neoplastic lesions was performed in a blinded fashion and according to standard procedures. Daily i.p injection of scramble siRNA or netrin-1 siRNA (4 μg per mouse) (or DCC, UNC5H1, or UNC5H2) were performed according the procedure established by SeleXel Corp. DCC-5Fbn treatments were performed according the Fig. 3 legend. Xenografts of fresh human breast tumors in nude mice were performed according the protocol developed by Xentech. Among 20 fresh breast tumors, the tumor BC174 expressing high levels of netrin-1 and of UNC5H receptors was selected. For each xenograft, when tumors reached 62 mm^3, PBS or 1.25 μg per gram of body weight DCC-5Fbn were administered i.v. every day.

ACKNOWLEDGMENTS. We thank O. Donze (Apotech, Lausanne, Switzerland) for advice and reagents; F. Cabon, I. Puisieux, and C. Delloye for technical advice; J. Blachier, A. Potemski, I. Durand, N. Gadot, and S. Goddard-Leon for excellent technical help; F. Miller, J. Adélaïde [Institut National de la Santé et de la Recherche Scientifique (INSERM) U 599, Marsielle, France] C. Caux, D. Birnbaum (INSERM U 590, Lyon, France), and G. Grelier (INSERM U 590, Lyon, France) for materials; H. Bilak for text correction; A. Puisieux for helpful discussion; Xentech for human breast tumor xenografts; and SeleXel for *in vivo* siRNA. This work was supported by an institutional grant from the Centre National de la Recherche Scientifique, Centre Léon Bérard, University of Lyon, and from the Ligue Contre le Cancer, Institut National du Cancer, Agence Nationale de la Recherche Blanche, and European Union Specific Targeted Research Project Hermione.

1. Serafini T, *et al.* (1996) Netrin-1 is required for commissural axon guidance in the developing vertebrate nervous system. *Cell* 87:1001–1014.
2. Keino-Masu K, *et al.* (1996) Deleted in Colorectal Cancer (DCC) encodes a netrin receptor. *Cell* 87:175–185.
3. Forcet C, *et al.* (2002) Netrin-1-mediated axon outgrowth requires deleted in colorectal cancer-dependent MAPK activation. *Nature* 417:443–447.
4. Ackerman SL, *et al.* (1997) The mouse rostral cerebellar malformation gene encodes an UNC-5-like protein. *Nature* 386:838–842.
5. Hong K, *et al.* (1999) A ligand-gated association between cytoplasmic domains of UNC5 and DCC family receptors converts netrin-induced growth cone attraction to repulsion. *Cell* 97:927–941.
6. Mehlen P, *et al.* (1998) The DCC gene product induces apoptosis by a mechanism requiring receptor proteolysis. *Nature* 395:801–804.
7. Llambi F, Causeret F, Bloch-Gallego E, Mehlen P (2001) Netrin-1 acts as a survival factor via its receptors UNC5H and DCC. *EMBO J* 20:2715–2722.
8. Mehlen P, Thibert C (2004) Dependence receptors: between life and death. *Cell Mol Life Sci* 61:1854–1866.
9. Bredesen DE, Mehlen P, Rabizadeh S (2005) Receptors that mediate cellular dependence. *Cell Death Differ* 12:1031–1043.
10. Fearon ER, *et al.* (1990) Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers. *Science* 247:49–56.
11. Kinzler KW, Vogelstein B (1996) Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 87:159–170.
12. Thiebault K, *et al.* (2003) The netrin-1 receptors UNC5H are putative tumor suppressors controlling cell death commitment. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:4173–4178.
13. Bernet A, *et al.* (2007) Inactivation of the UNC5C Netrin-1 receptor is associated with tumor progression in colorectal malignancies. *Gastroenterology* 133:1840–1848.
14. Shin SK, *et al.* (2007) Epigenetic and genetic alterations in Netrin-1 receptors UNC5C and DCC in human colon cancer. *Gastroenterology* 133:1849–1857.
15. Mazelin L, *et al.* (2004) Netrin-1 controls colorectal tumorigenesis by regulating apoptosis. *Nature* 431:80–84.
16. Grady WM (2007) Making the case for DCC, UNC5C as tumor-suppressor genes in the colon. *Gastroenterology* 133:2045–2049.
17. Muller A, *et al.* (2001) Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 410:50–56.
18. van 't Veer LJ, *et al.* (2002) Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 415:530–536.
19. Aslakson CJ, Miller FR (1992) Selective events in the metastatic process defined by analysis of the sequential dissemination of subpopulations of a mouse mammary tumor. *Cancer Res* 52:1399–1405.
20. Geisbrecht BV, Dowd KA, Barfield RW, Longo PA, Leahy DJ (2003) Netrin binds discrete subdomains of DCC, UNC5 and mediates interactions between DCC, heparin. *J Biol Chem* 278:32561–32568.
21. Mehlen P, Fearon ER (2004) Role of the dependence receptor DCC in colorectal cancer pathogenesis. *J Clin Oncol* 22:3420–3428.
22. Llambi F, *et al.* (2005) The dependence receptor UNC5H2 mediates apoptosis through DAP-kinase. *EMBO J* 24:1192–1201.
23. Inbal B, *et al.* (1997) DAP kinase links the control of apoptosis to metastasis. *Nature* 390:180–184.
24. Serafini T, *et al.* (1994) The netrins define a family of axon outgrowth-promoting proteins homologous to *C. elegans* UNC-6. *Cell* 78:409–424.
25. Yebra M, *et al.* (2003) Recognition of the neural chemoattractant Netrin-1 by integrins alpha6beta4 and alpha3beta1 regulates epithelial cell adhesion and migration. *Dev Cell* 5:695–707.
26. Srinivasan K, Strickland P, Valdes A, Shin GC, Hinck L (2003) Netrin-1/neogenin interaction stabilizes multipotent progenitor cap cells during mammary gland morphogenesis. *Dev Cell* 4:371–382.
27. Liu Y, *et al.* (2004) Novel role for Netrins in regulating epithelial behavior during lung branching morphogenesis. *Curr Biol* 14:897–905.
28. Park KW, *et al.* (2004) The axonal attractant Netrin-1 is an angiogenic factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:16210–16215.
29. Lu X, *et al.* (2004) The netrin receptor UNC5B mediates guidance events controlling morphogenesis of the vascular system. *Nature* 432:179–186.
30. Nguyen A, Cai H (2006) Netrin-1 induces angiogenesis via a DCC-dependent ERK1/2-eNOS feed-forward mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:6530–6535.
31. Wilson BD, *et al.* (2006) Netrins promote developmental and therapeutic angiogenesis. *Science.*
32. Larrivee B, *et al.* (2007) Activation of the UNC5B receptor by Netrin-1 inhibits sprouting angiogenesis. *Genes Dev* 21:2433–2447.
33. Andre F, *et al.* (2004) Breast cancer with synchronous metastases: trends in survival during a 14-year period. *J Clin Oncol* 22:3302–3308.
34. Tauszig-Delamasure S, *et al.* (2007) The TrkC receptor induces apoptosis when the dependence receptor notion meets the neurotrophin paradigm. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:13361–13366.
35. Latil A, *et al.* (2003) Quantification of expression of netrins, slits and their receptors in human prostate tumors. *Int J Cancer* 103:306–315.
36. de Kok JB, *et al.* (2005) Normalization of gene expression measurements in tumor tissues: comparison of 13 endogenous control genes. *Lab Invest* 85:154–159.

SI Materials and Methods

Cell Line, Transfection procedure and Reagents. 4T1 and 67NR cells were a kind gift from F. Miller (Karmanos Cancer Institute, Wayne State University, Detroit, MI). Human breast cell lines listed were cultured using standard procedures and were obtained from D. Birnbaum (Centre de Recherche en Cancérologie, INSERM UMR 599, Marseille 13009, France). 67NR and 4T1 cells were stably transfected using the lipofectamine reagent (Invitrogen) and puromycine (Sigma) selection. 4T1-luc cells were obtained by stable transfection of a CMV-luciferase vector bearing hygromycine resistance. Clones were selected by luminescence intensity using the luminoskan Ascent Station (Labsystems). DCC-EC-Fc was obtained from R & D Systems and Netrin-1 and UNC5H2-EC-Fc from Apotech /Axxora.

Human Breast Tumor Samples. Fifty-one human breast cancer samples were provided by the tumor bank of the Centre Léon Bérard. Fresh tissue of the tumor was obtained during breast surgery prior any systemic therapy and snap-frozen in liquid nitrogen.

Plasmid Constructs, siRNA, and DCC-5Fbn Production. The dominant-negative mutant for UNC5H (pCR-UNC5H2-IC-D412N) has been described (1). PGNET-1, encoding chick netrin-1, has been described (2). Ps974-DCC-5Fbn allowing bacterial expression of the fifth fibronectin type III domain of DCC was obtained by inserting a

Pst1/BamH1 DNA fragment generated by PCR using pDCC-CMV-S as a template. DCC-5Fbn production was performed using a standard procedure. Briefly, BL21 cells were forced to express DCC-5Fbn in response to imidazole and the BL21 lysate was subjected to affinity chromatography using Flag-sepharose (Sigma). GST-DCC-5Fbn and GST-FaDD were from Apotech /Axxora. For cell culture use, scramble and netrin-1 siRNAs were designed by Santa Cruz Biotechnology as a pool of three target-specific 20-25nt siRNAs. For the *in vivo* approach two different single netrin-1, DCC, UNC5H1, or UNC5H2 siRNAs were produced (Sigma-Proligo).

DCC/Netrin-1 ELISA Assays. DCC-EC-Fc (1.25ng/ml) or UNC5H2-EC-Fc (0.5ng/ml) was adsorbed on 96-well maxisorp plate (Nunc) according to manufacturer instruction. Flag-tagged Netrin-1 (0.5ng/ml) was then added together with increased concentrations of DCC-EC-Fc. After a 1-hour incubation, plates were extensively washed, and bound netrin-1 was detected by immunolabelling using an anti-flagM2 antibody (Sigma) and a HRP-goat-anti-mouse (Jackson). Colorimetric measurement was performed on the multilabel Victor station (Wallac).

Immunoprecipitation. Coimmunoprecipitations were carried out on HEK293T cells transfected with various tagged constructs as described previously (3). Briefly, HEK293T cells were lysed in 50 mM HEPES pH 7.6, 125 mM NaCl, 5 mM EDTA and 0.1% NP-40 in the presence of protease inhibitor, and further incubated with anti-HA (Sigma), anti-c-myc antibody (Sigma), anti-FlagM2 (Sigma) and protein-A Sepharose (Sigma). Washes were done in 50 mM HEPES pH 7.6, 125 mM NaCl, 5 mM EDTA.

Cell Death Assays. 67NR, 4T1, T47D, SKBR7 or MDAMB231 cells were grown in serum-poor medium and were treated (or not) with DCC-EC-Fc or DCC-5Fbn or transfected with siRNA using Lipofectamine 2000 (Life Technologies). Cell death was analyzed using trypan blue staining procedures as described (2). The extent of cell death is presented as the percentage of trypan blue-positive cells in the different cell populations. Cell survival was also measured 48h post-transfection/treatment by MTT assay using Vybrant MTT assay kit (Molecular Probes) according to the manufacturer procedures. Relative Caspase activity was determined by flow cytometric analysis as follows: 2 x 10^5 treated cells were harvested, washed once in 1 ml of PBS, and resuspended in 200μl of staining solution containing FITC-VAD-fmk (CaspACE, Promega). After incubation for 60 min at 37°C, cells were washed in 1 ml PBS and resuspended in 300 μl PBS for flow cytometry analysis. Stained cells were counted using a FACS Calibur (Becton Dickinson) and CellQuest analysis software with excitation and emission settings of 488 nm and 525–550 nm (filter FL1), respectively. Caspase activity was also measured as described previously (2) using ApoAlert CPP32 kit from Clontech.

Quantitative RT-PCR. To assay netrin-1, DCC, UNC5H receptors expression in human breast tumors, total RNA was extracted from biopsies of patients undergoing surgery for breast cancer using the Nucleospin RNAII kit (Macherey-Nagel) and 1 μg was reverse-transcribed using the iScript cDNA Synthesis kit (BioRad). Real-time quantitative RT-

PCR was performed on a LightCycler 2.0 apparatus (Roche) using the Light Cycler FastStart DNA Master SYBERGreen I kit (Roche). Reaction conditions for all optimal amplification, as well as primer selection of netrin-1, were determined as described (4). The ubiquitously expressed human HMBS (PBGD), TBP and mouse RPLP0 genes showing the least variability in expression between normal and breast tumoral tissues (5, 6) were used as internal controls. The sequences of the primers are available upon request.

Immunohistology and Immunohistochemistry. Paraffin embedded tumors tissues fixed in formalin were used for analysis. The pathologist selected representative areas from breast carcinomas (N+M0, M+) or liver or uterus metastasis. The blocks were sectioned at a thickness of 4 μm. After deparaffinization and rehydratation, tissue sections were boiled in buffer Ph9 using a water bath at 97°C for 50 minutes. For blocking endogenous peroxidases, the slides were incubated in 5% hydrogen peroxide in sterile water. The slides were then incubated at room temperature for 1 hour with a polyclonal goat antibody recognizing the human netrin-1(R & D Systems). This antibody was diluted using an antibody diluent solution (ChemMate; Dako) at 1/800. After rinsing in phosphate buffer saline, the slides were incubated with a biotinylated secondary antibody bound to a streptavidin peroxidase conjugate (Lsab+ Kit; Dako). Bound antibody was revealed by adding the substrate 3,3-diamino benzidine. Regarding netrin-1 immunostaining in 4T1 cells, 1 x 10^5 cells were cytospun on coverslips and fixed in 4% paraformaldehyde. The slides were then incubated at room temperature for 1 hour with a mouse netrin-1 antibody (R & D Systems). After rinsing in phosphate buffer

saline, the slides were incubated with an Alexa-Fluor 488 donkey anti-rat antibody (Molecular Probes). Nuclei were visualized with Hoescht staining.

Tumor Mouse Models. Female BALB/cByJ mice of 6-8 weeks of age from The Jackson Laboratory were used for surgery. For mammary gland injection of 67NR cells, mice were anesthetized with 2,2,2-tribromoethanol and 10^6cells in 50 μl of PBS were injected into the mammary gland and mice were killed when the tumor exceeded 1.5 cm and caused impediment to the movement of the animal. For intravenous injection, 10^5 (unless indicated in the figure legend) 4T1-luc cells in 150 μl of PBS were injected into a tail vein, and mice were either killed at day 13 or analyzed using luminescence recording. When animals were killed, lungs were removed, and metastatic nodules counted. Four-micron-thick lung or liver sections were also prepared and stained with hematoxylin-eosin-saffron. Histological classification and grading of neoplastic lesions was performed in a blinded fashion and according to standard procedures. For *in vivo* imaging of metastasis using 4T1-luc cells, the light resulting from the bioluminescent oxidation of the intraperitonaly injected endotoxin-free luciferin (Promega) (120 mg/kg of body weight) was detected and quantified (10 minutes after injection) with a NightOWL LB 981 NC 100 system from Berthold Technologies, using an anesthesia system with gaseous isoflurane from TEM SEGA. Daily i.p injections of scramble siRNA or netrin-1 siRNA (4μg per mouse) were performed according the procedure established by SeleXel Corp. DCC-5Fbn treatments were performed according the Fig. 3 legend.

Regarding xenograft of fresh human breast tumor in nude mice, 7- to 9-week old

females Hsd:Athymic Nude-Foxn1^{nu} mice obtained from Harlan were xenografted using human breast tumors according the protocol developed by Xentech. Netrin-1 and netrin-1 receptors expression was analyzed by QRT-PCR as in Fig.1*A* in a panel of 20 breast tumors, and the tumor BC174 was selected on the basis of high netrin-1 level and detected UNC5H receptors expression. Xenografted mice breeding was performed in the Centre d'Exploration et de Recherche Fonctionnelle Expérimentale (CERFE) (Evry, France) and in XenTech company (Pépinière Genopole Entreprises/CCIE, Evry, France). For each xenograft when tumors reached 62mm^3 PBS or 1.25 μg per g of bodyweight DCC-5Fbn were administered i.v every day. Animals were killed by cervical dislocation when the tumor reached a volume of 2,000 mm^3 or because of deteriorated health.

SiRNA Detection in Lung. The detection of netrin-1 siRNA in lung was performed by SeleXel (Paris, France) according the protocol described in ref.7.

Fig. 5. Netrin-1 and CXCR4 expression in human breast cancer. (*A*) Expression profile of *CXCR4* examined with QRT-PCR using *HMBS* gene expression as referenced in the human breast tumors described in Fig.1*A*. QRT-PCR was performed using total RNA extracted from 51 tumor biopsies. *CXCR4* expression is given as the ratio between *CXCR4* expression in each sample and the average of CXCR4 expression in the N0 samples as indicated by a horizontal bar. Nonparametric statistical significance tests (Mann-Whitney) were used, the *P* values are indicated. (*B*) The percentage of samples showing a netrin-1 expression higher than the average expression in N0 biopsies, 5-fold higher or 15-fold higher is indicated, as is the range of the overexpression. (*C*) Netrin-1 amplification bias using the oligodT method generally used in microarray platforms. RNA from two primary tumor samples (N0, M+) were extracted and cDNA was prepared using either hexamers or oligodT. Netrin-1 or CXCR4 levels were determined and a ratio of amplification between hexamers and oligodT is presented. Note that although no change appears for CXCR4, a 8- to 10-fold difference exists between netrin-1 cDNA amplification by both techniques. (*D*) Netrin-1 immunohistochemistry on sections of breast metastasis detected in the liver (*UPPER*) or in the uterus (*LOWER*). Enlargement is indicated.

Fig. 6. Netrin-1 is not sufficient to confer metastatic propensity to 67NR cells. (*A*) Q-RT PCR was performed using total RNA extracted from 67NR and 4T1 mouse cell lines

with specific mouse netrin-1 and netrin-1 receptors primers and the mouse gene RPLP0 as standard. Histogram showing the number of mRNA molecules for netrin-1 and netrin-1 receptors. An index is presented as the ratio between each sample to the number of netrin-1 mRNA molecules present in 4T1 cells. (*B* and *C*) Mock-transfected 67NR cells or 67NR cells stably transfected with netrin-1 (67NR-net1) were submitted to netrin-1 expression analysis. (*B*) RT-PCR using specific chicken netrin-1 primers was performed using total RNA extracted from 67NR-net1 and 67NR-mock cells. (*C*) Western blot using anti-c-myc or anti-chick netrin1 antibodies was performed. (*D*) Lung and liver metastasis of fat pad-injected mock 67NR cells versus 67NR netrin-1-expressing cells. One control cell clone bearing puromycine resistance (67NR-mock), one netrin-1-expressing cell clone (67NRnet1), and one polyclonal population of netrin-1 stably transfected 67NR (67NR-net1-polyclonal) were injected in fat pads of mice, and metastasis was analyzed in the lung or liver environment.

Fig. 7. Disruption of the netrin-1 autocrine loop triggers breast cancer cell death via UNC5H receptors. (*A*) DCC-EC-Fc displaces DCC/netrin-1 and UNC5H2/netrin-1 interaction. ELISA assay with DCC-EC-Fc (*LEFT*) or UNC5H2-EC-Fc (*RIGHT*) coated, and quantification of bound netrin-1 using anti-Flag-netrin-1 antibody in the presence of increasing competitor (DCC-EC-Fc) concentration or of an unrelated soluble protein (IL3R). (*B*) HEK293T cells were transfected with DCC expressing vector and incubated for 15 minutes with 300 ng/ml netrin-1 in the presence of not of DCC-EC-Fc (2 μg/ml, 3 μg/ml). PhosphoErk and total Erk western blots were performed as described in ref. 8 and are shown. (*C*) T47D cells were treated with scramble siRNA (control) or netrin-1

siRNA and cell death was determined the day after by caspase activity assay. An index is presented as the ratio of fluorescence between netrin-1 siRNA-transfected T47D cells and scramble siRNA-transfected cells. Standard deviations are indicated (n = 3). (*D*) HEK293T cells were transfected with a mock or UNC5H2-expressing vector together or not with UNC5H2-IC-D412N encoding the intracellular portion of UNC5H2 mutated in its caspase site. Forty-eight hours after transfection, cell death was measured as described (1, 9) using TUNEL staining. Note that UNC5H2-IC-D412N fully inhibits cell death induced by full-length UNC5H2. Standard deviations are indicated (n = 3). Mann-Whitney tests were performed, and a *P* value is indicated. Similar results were obtained if UNC5H1 or UNC5H3 were expressed instead of UNC5H2, supporting the fact that UNC5H2-IC-D412N acts as a dominant-negative mutant for UNC5H proapoptotic activity (data not shown).

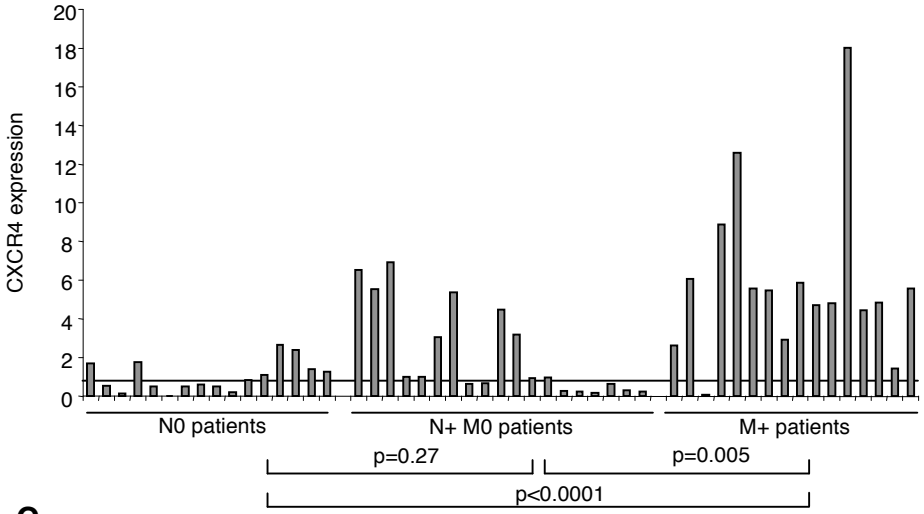
Fig. 8. The antimetastatic effect of netrin-1 siRNA depends on UNC5H1, and UNC5H2 is detected in lung after i.p. injection. (*A*) Netrin-1 siRNA is detected in the lung of netrin-1 siRNA i.p injected mice. Lungs were collected 30 minutes after i.p injection with netrin-1 siRNA or scramble siRNA and netrin-1 siRNA was analyzed according to the ref. 7 protocol. (*B*) 4T1 i.v. injected mice were treated daily with siRNA combination as indicated and as in Fig.3 *A*-*C*, and the number of metastasis was quantitated. In *A* and *B*, standard deviations are indicated (n = 3). Mann-Whitney tests were performed, and a *P* value is indicated.

1. Llambi F, Causeret F, Bloch-Gallego E, Mehlen P (2001) Netrin-1 acts as a survival factor via its receptors UNC5H and DCC. *Embo J* 20: 2715-2722.
2. Mehlen P, *et al.* (1998) The DCC gene product induces apoptosis by a mechanism requiring receptor proteolysis. *Nature* 395: 801-804.
3. Forcet C, *et al.* (2001) The dependence receptor DCC (deleted in colorectal cancer) defines an alternative mechanism for caspase activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 3416-3421.
4. Mazelin L, *et al.* (2004) Netrin-1 controls colorectal tumorigenesis by regulating apoptosis. *Nature* 431: 80-84.
5. de Cremoux P, *et al.* (2004) Inter-laboratory quality control for hormone-dependent gene expression in human breast tumors using real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. *Endocr Relat Cancer* 11: 489-495.
6. de Kok JB, *et al.* (2005) Normalization of gene expression measurements in tumor tissues: Comparison of 13 endogenous control genes. *Lab Invest* 85: 154-159.
7. Compagno D, *et al.* (2007) SIRNA-Directed In Vivo Silencing of Androgen Receptor Inhibits the Growth of Castration-Resistant Prostate Carcinomas. *PLoS ONE* 2: e1006.
8. Forcet C, *et al.* (2002) Netrin-1-mediated axon outgrowth requires deleted in colorectal cancer-dependent MAPK activation. *Nature* 417**:** 443-447.

9. Llambi F, *et al.* (2005) The dependence receptor UNC5H2 mediates apoptosis through DAP-kinase. *Embo J* 24: 1192-1201.

Fig. 5

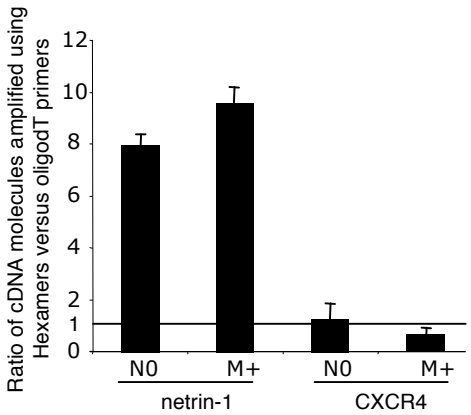
A



B

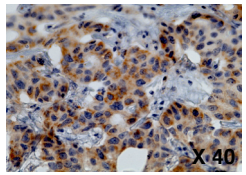
n=51		N0 Patients (n=16)	N+ M0 Patients (n=19)	M+ Patients (n=16)
% of breast tumors that over-express netrin-1		31	73.7	93.7
	more than 5 fold	0	31.5	62.5
	more than 15 fold	0	0	37.5
Range of netrin-1 over-expression		0.02-4.6	0.03-12.8	0.6-111.7

C



D

Liver metastasis



Uterus metastasis

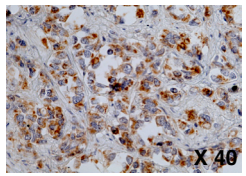
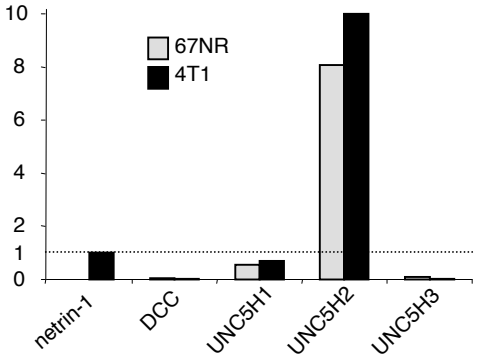
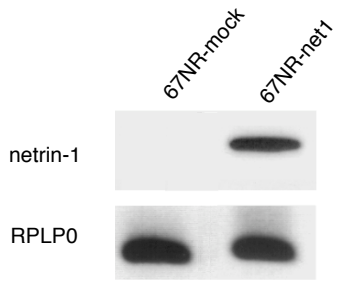


Fig. 6

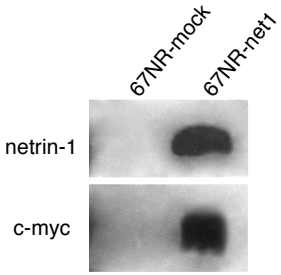
A



B



C



D

Injected cells	Mice (n)	Primary tumors	Metastasis	Comment
67NR-mock	9	9	0	
67NR-net1	7	7	0	Suspicion of 1 micrometastase in liver
67NR-net1 polyclonal	12	12	0	Suspicion of 1 micrometastase in lung

Fig. 7

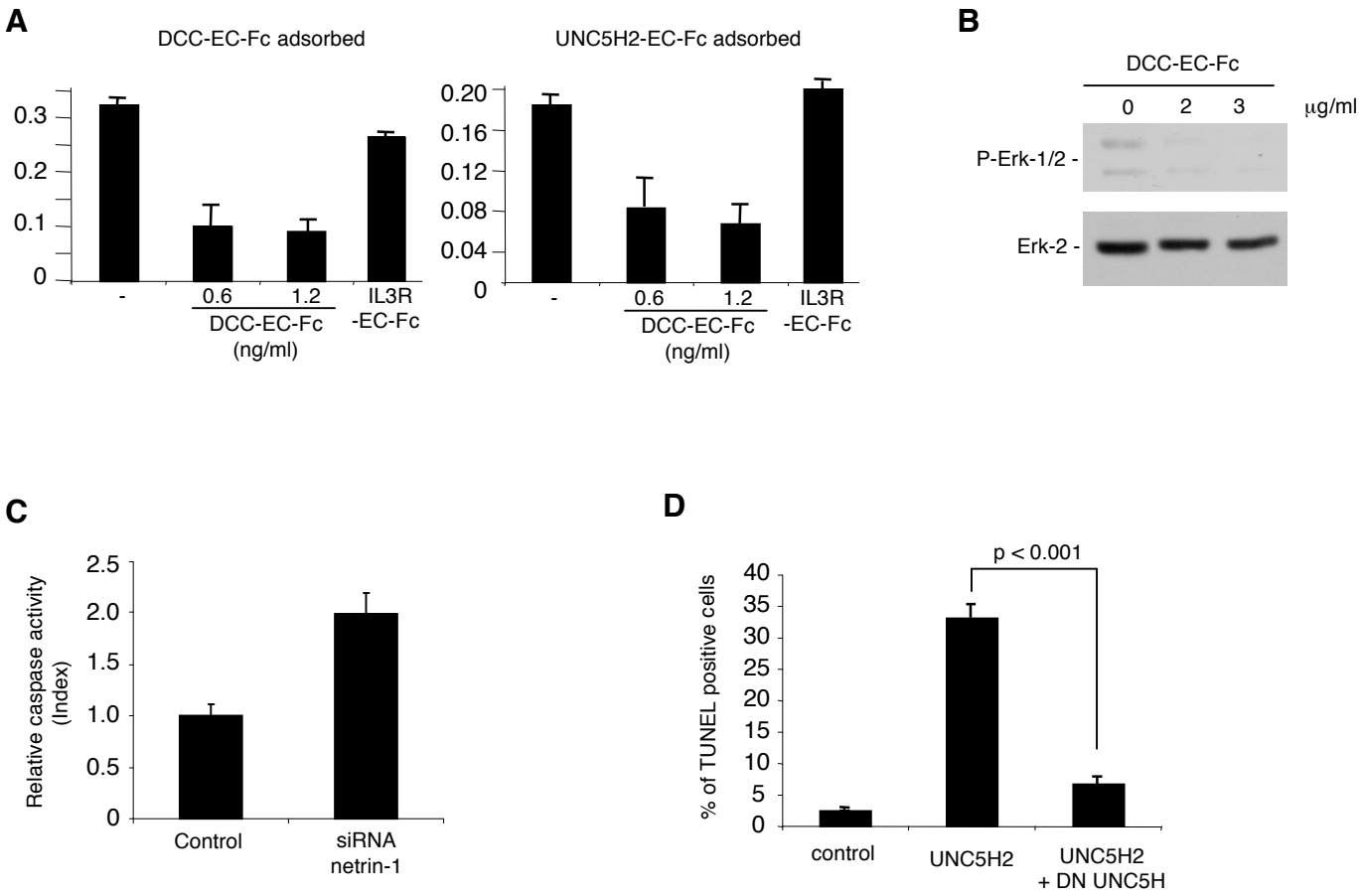
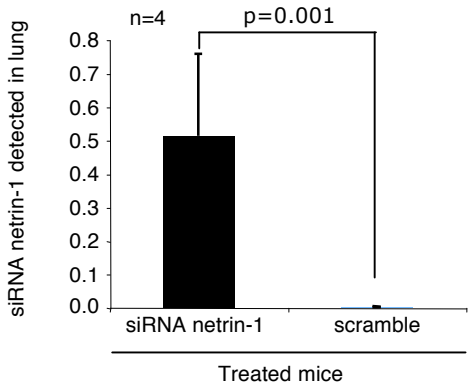
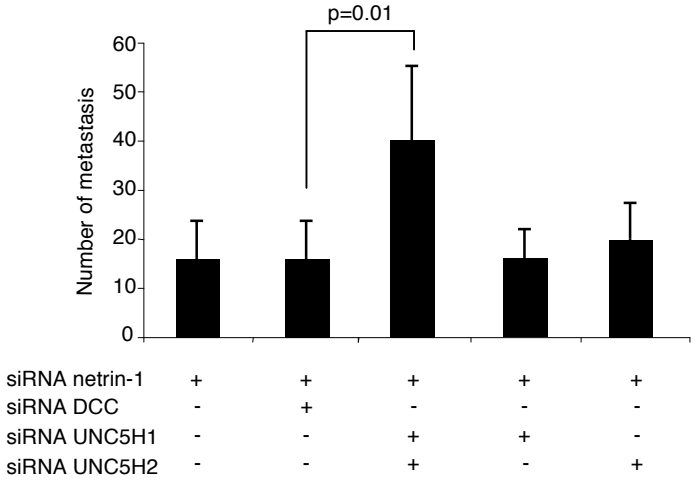

A
DCC-EC-Fc adsorbed
UNC5H2-EC-Fc adsorbed
0.3
0.2
0.1
0
0.20
0.16
0.12
0.08
0.04
0
-
0.6
1.2
DCC-EC-Fc
(ng/ml)
IL3R
-EC-Fc
B
DCC-EC-Fc
0
2
3
μg/ml
P-Erk-1/2 -
Erk-2 -
C
Relative caspase activity
(Index)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0
Control
siRNA
netrin-1
D
% of TUNEL positive cells
p < 0.001
40
35
30
25
20
15
10
5
0
control
UNC5H2
UNC5H2
+ DN UNC5H

Fig. 8

A


n=4
p=0.001
siRNA netrin-1 detected in lung
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
siRNA netrin-1
scramble
Treated mice

B


p=0.01
Number of metastasis
60
50
40
30
20
10
0
siRNA netrin-1 + + + + +
siRNA DCC - + - - -
siRNA UNC5H1 - - + + -
siRNA UNC5H2 - - + - +

Article 2 (en préparation) : La surexpression de Nétrine-1 est corrélée à l'agressivité tumorale dans le cancer du sein et son inhibition est une nouvelle perspective thérapeutique

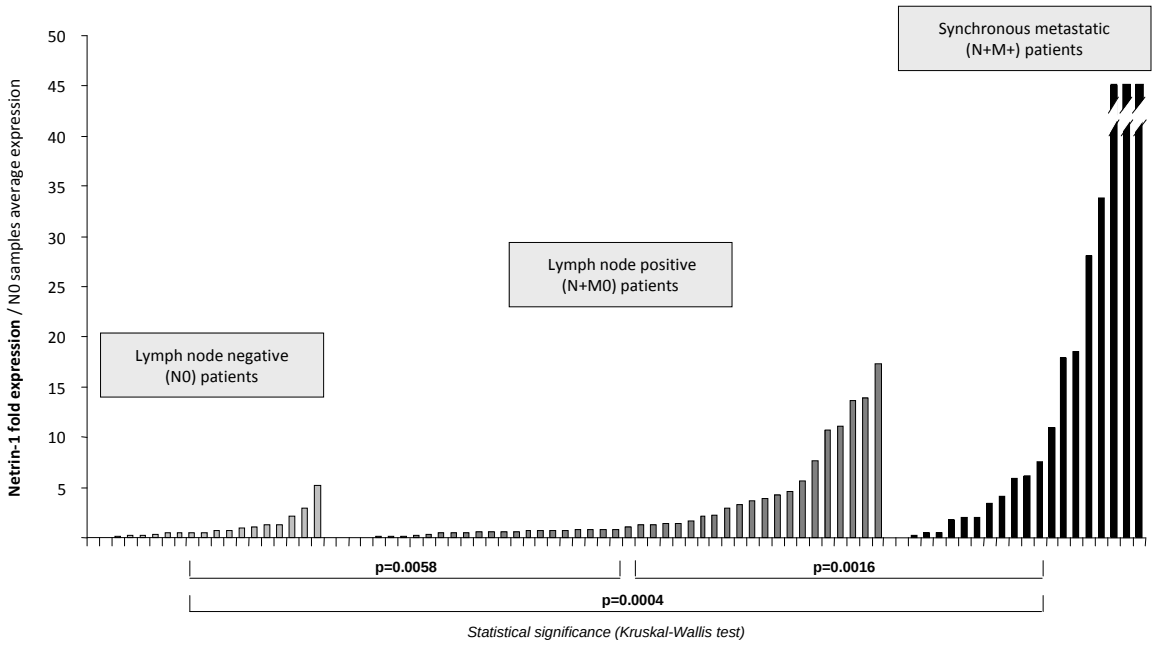
Guenebeaud C.*, Fitamant J.*, Delcros JG., Bachelot T., Scoazec JY., Bernet A., Mehlen P.
(* co-premiers auteurs)

Nous avons poursuivi les travaux sur la tumorigenèse mammaire en nous concentrant sur l'aspect pronostique que pourrait avoir la Nétrine-1 sur les cancers du sein mais aussi sur l'effet du DCC-5Fbn sur des tumeurs humaines et son utilisation potentielle en tant que thérapie ciblée. Les résultats présentés ici sont préliminaires et n'ont pas encore été publiés.

Pour cette étude, l'expression de la Nétrine-1 au sein d'une nouvelle cohorte de 80 tumeurs mammaires a été analysée par RT-PCR-Quantitative, puis recoupée avec les données propres à chaque patiente : origine du cancer, statut ménopause, taille et grade de la tumeur, invasion vasculaire et ganglionnaire, positionnement dans la classification TNM (*Tumor, Node, Metastasis*), statut métastatique, et statut des marqueurs ER et PR (récepteurs à l'estradiol et progestérone respectivement) et HER2. Nous avons retrouvé la corrélation entre le taux de Nétrine-1 et la dissémination métastatique décrite précédemment (Fitamant et al., 2008) et de manière intéressante nous avons également observé une corrélation entre la forte expression de Nétrine-1 et l'invasion ganglionnaire (**figure IA**). De plus, une forte expression de la Nétrine-1 est associée de manière significative à un nombre accru de ganglion envahit, à une invasion des tissus locaux (mammelon et paroi thoracique) ainsi qu'à une surexpression de l'oncogène HER2. En revanche, cette analyse n'a pas permis de mettre en relation le statut ménopause, le type cellulaire de cancer, le grade et la taille de la tumeur, la vascularisation tumorale ou encore l'expression des récepteurs hormonaux PR et ER avec le taux d'expression de la Nétrine-1 dans les cancers mammaires.

Ainsi, ces données suggèrent que dans les cancers mammaires la Nétrine-1 a un rôle pro-disséminatoire distal (formation de foyers métastatiques) mais aussi un rôle pro-invasif proximal (envahissement des ganglions et des tissus adjacents à la tumeur). L'association entre la surexpression de l'oncogène HER2 et la Nétrine-1 particulièrement intéressante mérite d'être confirmée sur un nombre plus important de biopsies tumorales car ici, le degré de significativité n'est pas élevé ($p=0.05$). En effet, HER2 est un oncogène surexprimé dans environ 20% des cancers du sein et leur confère un statut particulièrement aggressif. Des thérapies ciblées visent à inactiver spécifiquement cet oncogène (ex : Herceptine®) mais des phénomènes de résistance tumorale existent vis-à-vis de ces traitements. Il serait donc d'un

A



B

Tumor characteristics		cases N=80	Netrin mRNA expression level Median (Range)	*p-value*
Menopause				
	yes	46	0.42 (0.01-20)	0.96
	no	27	0.54 (0.06-12)	
Histological type				
	ductal	64	0.37 (0.01-62)	
	lobular	10	1.12 (0.18-8.1)	0.26
	other	6	1.24 (0.01-4.69)	
Grade (SBR)				
	1	9	0.54 (0.01-20)	
	2	35	0.31 (0.01-12)	0.33
	3	30	0.44 (0.06-62)	
Tumor size(pT, mm)				
	<20	3	0.91 (0.01-1.6)	
	20-50	54	0.33 (0.01-62)	0.13
	> 50	21	1.3 (0.01-12)	
Vascular invasion				
	no	19	0.95 (0.01-62)	0.1
	yes	52	0.33 (0.01-20)	
Chest wall or skin/nipple invasion (pT4)				
	no	**49**	**0.32 (0.01-62)**	**0.02**
	yes	**31**	**0.88 (0.01-20)**	
Nodal involvement (pN stage)				
	pN0	**19**	**0.21 (0.01-2.26)**	**0.005**
	pN1	**60**	**0.69 (0.01-20)**	
Nodal involvement (Number of involved nods)				
	0	**19**	**0.21 (0.01-2.26)**	
	1-3	**28**	**0.34 (0.01-12)**	**0.002**
	>3	**32**	**1.46 (0.01-20)**	
Metastatic at diagnosis (stage IV)				
	M0	**62**	**0.33 (0.01-7.62)**	**0.0001**
	M1	**18**	**3.0 (0.1-62)**	
pTNM status				
	pN0M0	**19**	**0.21 (0.01-2.26)**	
	pN1M0	**43**	**0.36 (0.01-7.62)**	**0.0001**
	pN1M1	**18**	**3.0 (0.1-62)**	
Estrogen receptor (IHC or LBA)				
	ER+	59	0.48 (0.01-62)	0.78
	ER-	18	0.61 (0.1-20)	
Progesterone receptor (IHC or LBA)				
	PR+	59	0.54 (0.01-62)	0.58
	PR-	18	0.47 (0.06-20)	
HER2 status (IHC)				
	positive (+++)	**12**	**1.59 (0.13-14)**	**0.05**
	negative (0 or + or ++)	**61**	**0.39 (0.01-20)**	

Figure I. Présentation des taux d'expression de *nétrine-1* dans des tumeurs primaires de patientes atteintes d'un cancer du sein.

(A) Les expressions de *nétrine-1* ont été mesurées par RT-PCR quantitative à partir de 80 biopsies de tumeurs du sein de patientes présentant un cancer localisé (N0), un envahissement ganglionnaire (N+) ou des métastases distantes (N+M+) au moment du diagnostic. Le graphique montre une corrélation significative entre les taux d'expression de *nétrine-1* et le stade d'avancement/d'agressivité de la maladie.

(B) Les 80 tumeurs ont été classées selon différents critères cliniques. Pour chaque sous-groupe, la valeur médiane d'expression de *nétrine-1* est indiquée, ainsi que la significativité des différences d'expression. Cette analyse met en évidence qu'une forte expression de *nétrine-1* est corrélée à une invasion locale de la peau et de la paroi thoracique, à un envahissement ganglionnaire, au nombre de ganglions envahis, à un envahissement métastatique, ainsi qu'à une forte expression de l'oncogène *HER2*.

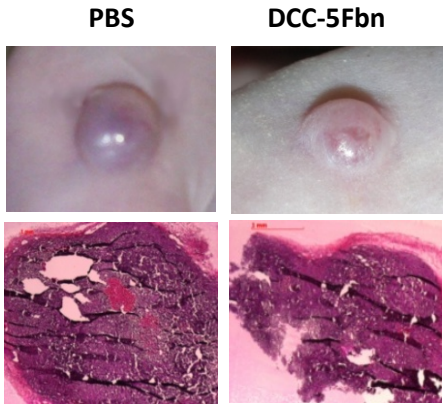
intérêt thérapeutique certain de pouvoir identifier parmi cette population HER2^{+}, une sous-population susceptible de bénéficier d'un traitement alternatif ou complémentaire dirigé contre la Nétrine-1.

Dans un second temps, nous avons cherché à valider l'approche thérapeutique consistant à rétablir l'activité pro-apoptotique des récepteurs à dépendance fixant la Nétrine-1 dans un modèle plus proche de la tumorigenèse mammaire humaine que le modèle syngénique utilisant les souris Balb/C et la lignée 4T1 présenté précédemment (Fitamant et al., 2008). Pour cela, nous avons utilisé deux modèles tumoraux distincts chez la souris nude : (i) des xénogreffes de lignées mammaires tumorales humaines (étude menée au laboratoire) et (ii) des xénogreffes de biopsies tumorales mammaires directement dérivées de tumeurs fraîches humaines (étude réalisée par la société XenTech issue de l'institut Curie).

Au laboratoire, nous avons réalisé des xénogreffes des cellules T47D (Nétrine-1 +++) et MDA-MB231 (Nétrine-1 -) décrites précédemment (Fitamant et al., 2008) dans le flanc de souris *nude* qui ont été traitées quotidiennement avec le peptide DCC-5Fbn ou bien du PBS par voie intra-tumorale pendant une durée de 14 jours. Nous avons mesuré 3 fois par semaine le volume des tumeurs et obtenus les résultats présentés **figure IIA**. Nous avons observé une régression des tumeurs T47D traitées au DCC-5Fbn par rapport aux tumeurs contrôles traitées au PBS associée à une forte activation de la caspase 3 (**figure IIB**) alors qu'aucun effet du DCC-5Fbn n'a été observé sur la croissance des xénogreffes MDA-MB231 (**figure IIA**). L'analyse histopathologique des tumeurs a permis de mettre en évidence dans les tumeurs T47D traitées avec le peptide DCC-5Fbn une réduction importante du nombre de foyer tumoraux et de nombreuses zones nécrotiques alors que les tumeurs MDA-MB231 issues des souris traitées et non-traitées présentent une morphologie similaire avec de nombreux foyers de prolifération cellulaire (**figure IIA**).

Le modèle tumoral correspondant aux biopsies de tumeurs humaines fraîches est particulièrement intéressant car il est proche de la tumorigenèse humaine et reprend ses principales étapes : la formation d'une tumeur primaire (sous-cutanée) puis la formation de métastases pulmonaires. Après réalisation des greffes, les souris ont été réparties en trois lots : un groupe contrôle traité au PBS, un groupe traité avec une chimiothérapie considérée comme traitement de référence (adryamicine, cyclophosphamide) et un groupe traité avec le peptide DCC-5Fbn. Les tumeurs primaires ont été mesurées 2 fois par semaine et les courbes de croissance sont représentées **figure IIC**. Après 3 semaines, les souris ont été euthanasiées et le nombre de métastases pulmonaires a été quantifié. Les résultats obtenus montrent que le peptide DCC-5Fbn est capable de bloquer la croissance tumorale de manière plus importante

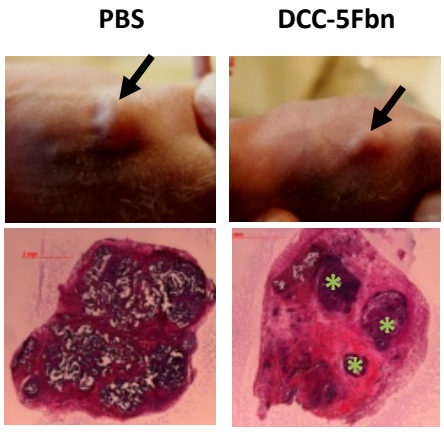
A



MDAMB-231

(Net-)

Treatment	Tumor growth (50-100%)	Tumor regression (30-80%)
PBS	4/4	0/4
DCC-5Fbn	4/4	0/4

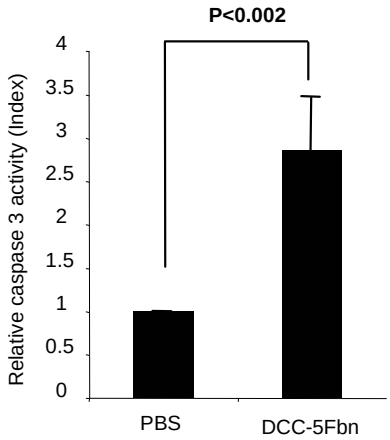


T47D

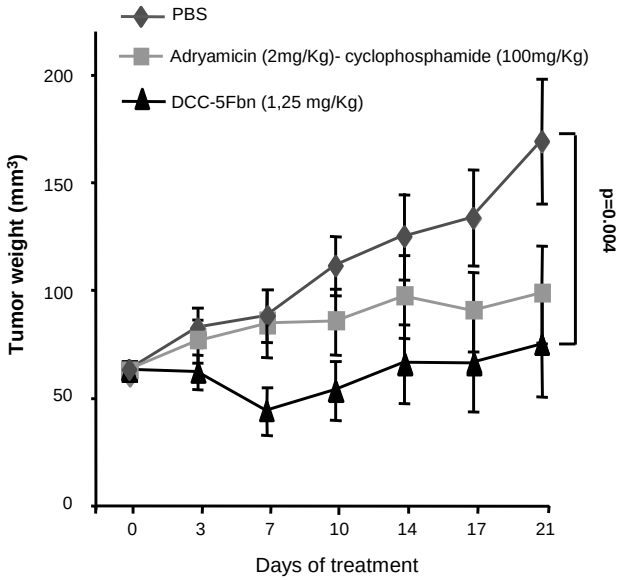
(Net+)

Treatment	Tumor growth (50-100%)	Tumor regression (30-80%)
PBS	5/6	0/6
DCC-5Fbn	0/7	5/7

B



C



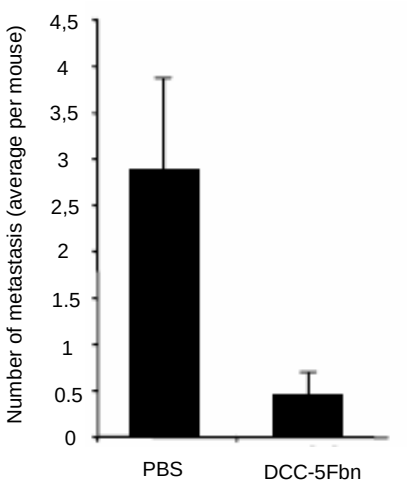


Figure II. Validation de l'efficacité du peptide DCC-5Fbn à partir de deux modèles humains de cancer du sein

(A) Dans un premier modèle, des souris immunodéficientes ont subies une greffe sous-cutanée, soit avec la lignée humaine de cancer du sein MDA-MB-231 n'exprimant pas la *nétrine-1* (Net-) , soit avec la lignée T47D exprimant fortement la *nétrine-1* (Net+), ces deux lignées étant capables de se développer et de former des tumeurs. Le traitement par voie intra-tumorale de ces souris avec une solution de DCC-5Fbn, entraîne spécifiquement une régression des tumeurs T47D. Cette régression se caractérise à l'analyse anatomopathologique des tumeurs par une forte diminution du nombre de foyers tumoraux et la présence de foyers nécrotiques (désignés par des étoiles vertes) **(B)** La régression des tumeurs T47D est attribuée à une apoptose des cellules tumorales induite par le DCC-5Fbn, les cellules de ces tumeurs présentant une augmentation significative de leur activité caspase-3 par rapport aux tumeurs traitées au PBS. **(C)** Dans un second modèle, les fragments d'une tumeur fraîche humaine, sélectionnée pour sa forte expression de *nétrine-1*, ont été greffées chez des souris immunodéficientes. L'effet d'un traitement avec le DCC-5Fbn par voie intraveineuse sur la progression tumorale a été comparé à celui d'un traitement au PBS ou d'un traitement chimiothérapeutique classique Adryamicine-Cyclophosphamide. Les courbes de croissance tumorales montrent une efficacité significative du traitement avec le DCC-5Fbn. Par ailleurs, le traitement avec le DCC-5Fbn s'accompagne d'une forte diminution du nombres de métastases pulmonaires formées à partir de la tumeur primaire.

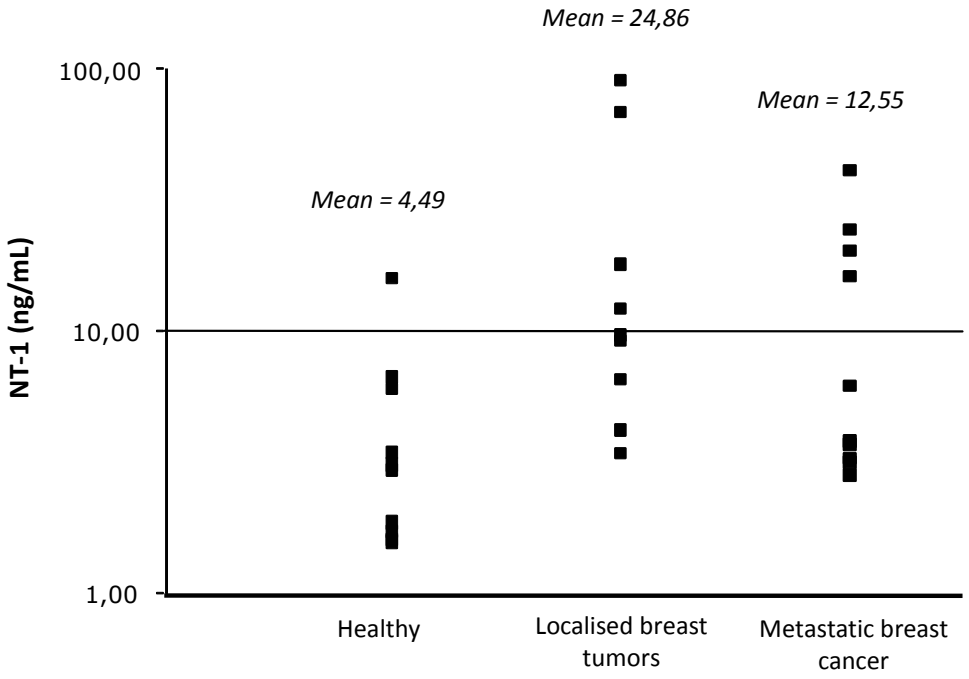
que la chimiothérapie de référence. En outre, dans ce modèle le peptide est également capable de prévenir la formation de métastases pulmonaires (**figure IIC**). Ainsi, l'ensemble de ces données *in vivo* confirment que l'inhibition de la fixation de la Nétrine-1 sur ses récepteurs à dépendance par le peptide DCC-5Fbn est suffisante pour induire l'apoptose des cellules tumorales surexprimant la Nétrine-1 et inhiber l'échappement métastatique au cours de la tumorigenèse mammaire.

La mise en application d'une thérapie ciblée nécessite non seulement le développement de molécules efficaces dirigées contre des cibles définies, mais nécessite également l'identification de marqueurs permettant de sélectionner les patients succeptibles de bénéficier de ces approches. La sélection des patientes pouvant bénéficier d'une thérapie basée sur l'inhibition de la Nétrine-1 peut se faire a priori par deux approches. La première approche consisterait à quantifier la Nétrine-1 sur une biopsie tumorale prélevée chez la patiente. Une deuxième approche moins contraignante et moins coûteuse serait de pouvoir détecter des taux anormalement élevés de Nétrine-1 dans le sang. A l'heure actuelle, ce type de dosage est par exemple utilisé pour suivre l'évolution des cancers de la prostate : le taux sanguin de PSA (*Prostatic Specific Antigen*) est en effet corrélé à la taille des tumeurs de la prostate et permet ainsi de suivre la réponse tumorale à un traitement et de diagnostiquer les rechutes.

Nous avons donc cherché à savoir d'une part si la Nétrine-1 soluble pouvait être détectée dans le sang circulant et d'autre part si un fort taux de Nétrine-1 était caractéristique des patientes atteintes d'un cancer du sein.

Actuellement nous sommes actuellement en train de développer une méthode simple basée sur un test ELISA qui permettrait de doser la Nétrine-1 dans le sang circulant et d'en faire ainsi un marqueur facilement accessible. En première approche, nous avons réalisé un dosage de la Nétrine-1 chez 29 patientes à partir d'échantillons de sérum. Le sérum se distingue du plasma par l'absence de fibrinogène qui est responsable de la coagulation. Il est donc plus facile à obtenir et l'absence d'anti-coagulant évite l'introduction d'un biais potentiel (par modification du pH, de la concentration en sel ou encore par l'ajout de molécules exogènes comme l'héparine). Les résultats de ce dosage par ELISA sont présentés **figure III**. Nous avons observé que le taux de Nétrine-1 sérique est plus élevé chez les patientes présentant des tumeurs mammaires par rapport aux individus sains (**figure IIIA**). De manière surprenante, les résultats préliminaires indiquent également que le taux de Nétrine-1 sérique chez les patientes présentant des métastases est inférieur au taux de Nétrine-

A



B

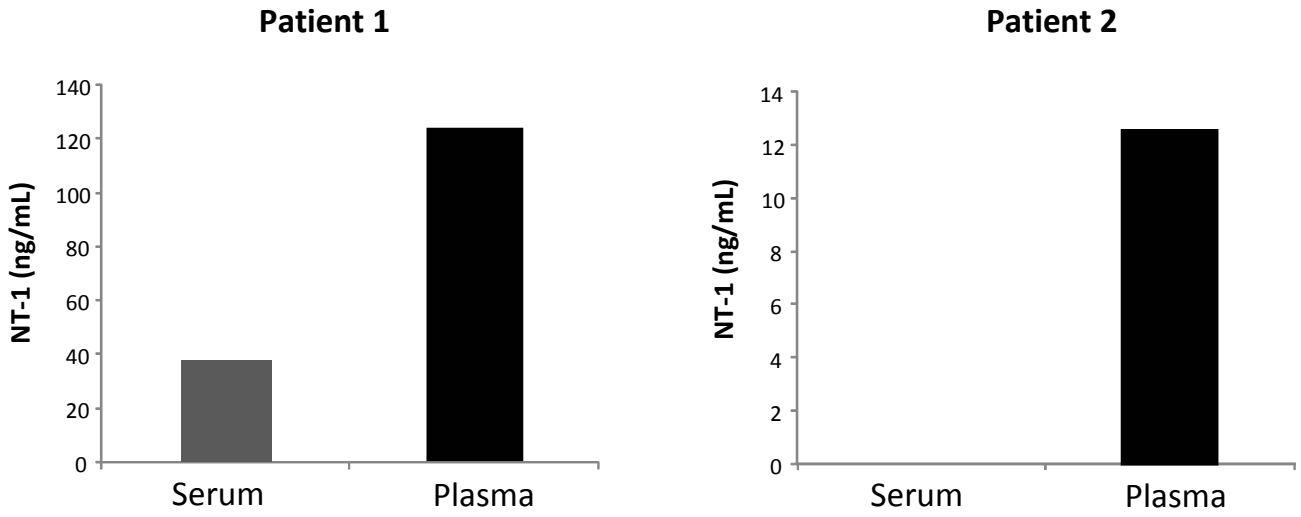


Figure III. Quantification du taux de nétrine-1 soluble humaine par méthode ELISA à partir de sérums et plasmas sanguins. **(A)** Les taux de nétrine-1 ont été mesurés à partir d'une série de 29 échantillons de sérums, prélevés chez des patientes saines, atteintes d'un cancer du sein localisé ou d'un cancer du sein métastatique. Cette analyse met en évidence que les plus faibles taux de protéine soluble sont retrouvés chez les femmes ne présentant pas de cancer. A l'inverse, les patientes atteintes d'un cancer localisé présentent en moyenne des taux de nétrine-1 sérique plus élevés que les patientes atteintes d'un cancer du sein métastatique. **(B)** Les taux de nétrine-1 sériques et plasmatiques ont été comparés à partir de sang frais prélevé chez deux patientes atteintes d'un cancer métastatique du sein. Cette comparaison met en évidence des taux de nétrine-1 soluble bien plus élevés dans les plasmas que dans les sérums de chacune des deux patientes.

1 sérique des patientes à cancers localisés ce qui est contradictoire avec les données obtenues par RT-PCR-Quantitative (**figure IIIA**). Toutefois, les variations observées sont trop importantes pour valider statistiquement cette observation et l'analyse d'un plus grand nombre d'échantillon est nécessaire pour confimer ou infirmer ce résultat.

De plus, l'analyse du taux de Nétrine-1 sérique et plasmatique sur une même patiente révèle que la méthode ELISA basée sur le dosage sérique est peu sensible en comparaison avec un dosage plasmatique. En effet, le taux de Nétrine-1 détecté dans le plasma est au moins 3 fois supérieur au taux de Nétrine-1 détecté dans le sérum pour une même patiente atteinte d'un cancer du sein métastatique (**figure IIIB**). Une hypothèse pour expliquer cette différence de détection est une interaction aspécifique de la Nétrine-1 (via son domaine C-terminal connu pour interagir avec des constituants de la matrice extracellulaire et les membranes cellulaires) avec le fibrinogène ou avec les cellules sanguines présents dans le plasma mais absents dans le sérum.

L'ensemble de ces résultats révèle donc un problème de sensibilité des tests sériques jusqu'alors réalisés et nous essayons actuellement de mettre au point un test ELISA basé sur la détection de la Nétrine-1 dans le plasma. Les tests en cours visent à déterminer quel anticoagulant nous pourrions utiliser pour doser la Nétrine-1 plasmatique en interférant le moins possible avec le test ELISA lui-même pour obtenir des résultats non-biaisés. En effet, certains anticoagulants modifient le pH (exemple : le Citrate de sodium) ou la concentration en sel (exemple : EDTA), éléments pouvant entraîner des modifications conformationelles des protéines et donc perturber les dosages utilisant des anticorps dirigés contre des épitopes spécifiques. La Nétrine-1 est également capable de lier les groupements héparane-sulfate et ainsi, l'utilisation de l'héparine comme anticoagulant pourrait aussi pertuber le test.

En conclusion, ces résultats, bien que préliminaires, permettent de compléter notre première étude effectuée sur le rôle de la Nétrine-1 dans les cancers du sein. Ils confirment tout d'abord à partir de l'analyse d'un plus grand nombre de biopsies, la corrélation entre la surexpression de Nétrine-1 et la dissémination métastatique, mais aussi avec d'autres marqueurs d'aggressivité comme le nombre de ganglions envahis, l'invasion des tissus adjacents et également potentiellement avec le marqueur d'aggressivité tumorale HER2. Par ailleurs, l'utilisation de plusieurs modèles proches de la tumorigenèse mammaire humaine a permis de valider *in vivo* l'effet d'une éventuelle thérapie basée sur l'inhibition de la Nétrine-1 à la fois sur la croissance tumorale et sur la dissémination métastatique. En particulier, nous avons montré sur un modèle utilisant des tumeurs mammaires fraîches humaines

surexprimant la Nétrine-1 que le peptide DCC-5Fbn avait une efficacité supérieure à la chimiothérapie de référence sur la régression tumorale et l'échappement métastatique. Enfin, les premiers résultats obtenus sur la quantification du taux de la Nétrine-1 dans le sang a permis de montrer qu'un dosage de Nétrine-1 est réalisable. Toutefois, contrairement à ce qui a été observé à partir de l'analyse des tumeurs primaires, il apparaît en première approche que les taux de Nétrine-1 les plus élevés ne sont pas détectés dans les sérums de patientes avec des cancers métastatiques sans doute à cause d'un problème de détection de la Nétrine-1 dans le sérum. Pour répondre à ces différents points, nous sommes actuellement en train d'élargir le nombre d'échantillon sérique analysé et de mettre au point une méthode de dosage de la Nétrine-1 plasmatique.

Article 3 : Le blocage de la Nétrine-1 induit la mort cellulaire dans les cancers du poumon non-à-petites-cellules

Interference with netrin-1 triggers tumor cell death in Non Small Cell Lung Cancer

Delloye-Bourgeois C., Brambilla E., Coissieux MM., Guenebeaud C., Pédeux R., Brambilla C., Mehlen P., Bernet A., JNCI 2009

Après les travaux réalisés sur le cancer du sein, nous nous sommes intéressés à un autre cancer fréquent : le cancer du poumon non-à-petites-cellules. Pour ces travaux, j'ai participé à la caractérisation du rôle de la Nétrine-1 dans la tumorigenèse pulmonaire *in vivo* par la réalisation de xénogreffes chez la souris *nude*.

Nous avons analysé le taux d'expression de Nétrine-1 par RT-PCR-Quantitative dans 92 échantillons tumoraux par rapport aux tissus sains adjacents. Nous avons observé qu'environ 80% des tumeurs présentaient une surexpression de Nétrine-1 sans corrélation significative avec le grade tumoral ou avec le type tumoral analysé (adénocarcinomes ou carcinomes épidermoïdes, ces deux types de cancers du poumon non-à-petites-cellules étant les plus fréquents). Ces résultats ont été confirmés par immunomarquage anti-Nétrine-1 et par des hybridations *in situ* sur des coupes de tumeurs. De manière intéressante, alors que les immunohistochimies révèlent une présence diffuse de la Nétrine-1 dans le poumon, les hybridations *in situ* indiquent clairement que l'ensemble des cellules tumorales n'exprime pas la Nétrine-1 mais que seule une sous-population tumorale épithéliale possède cette propriété. Par ailleurs, il a été montré que l'expression des récepteurs UNC5H1-4 était conservée entre tissu sain et tumoral alors que l'expression du récepteur DCC était systématiquement perdue.

Afin d'étudier le rôle de la Nétrine-1 dans la tumorigenèse pulmonaire, nous avons analysé le taux d'expression de la Nétrine-1 dans un panel de 25 lignées tumorales pulmonaires humaines. Nous avons ainsi caractérisé les lignées H358, H322 et A427 comme des lignées exprimant fortement la Nétrine-1 de manière autocrine et la lignée H460 comme une lignée n'exprimant pas la Nétrine-1 (montré par RT-PCR-Quantitative puis confirmé par immunohistochimie). L'expression des récepteurs UNC5H1-4 a également été détectée dans l'ensemble de ces lignées contrairement à l'expression du récepteur DCC dont l'expression est systématiquement perdue.

Nous avons montré que la Nétrine-1 produite de manière autocrine par les lignées pulmonaires tumorales Nétrine-1 positive était un facteur de survie pour ces cellules *in vitro* et nous avons également montré que les mécanismes pro-apoptotiques induits par la privation de Nétrine-1 impliquaient les récepteurs UNC5H et la DAPk. L'inhibition de la Nétrine-1 par

siRNA ou par le peptide DCC-5Fbn induit la mort des cellules Nétrine-1 positives H358, H322 et A4127 par apoptose *in vitro* alors qu'aucun effet de ces agents anti-Nétrine-1 n'est constaté sur la lignée H460. Par ailleurs, nous avons montré dans la lignée H358 que l'apoptose induite par l'inhibition de la Nétrine-1 était principalement liée à l'activation des voies de signalisation apoptotiques des récepteurs UNC5H1 et UNC5H2 car la co-transfection de siRNA ciblant ces deux récepteurs inhibe la mort cellulaire induite par le siRNA Nétrine-1 (lignée H358) au contraire des siRNA dirigés contre les récepteurs UNC5H3, UNC5H4 et DCC. De plus, il a été montré que cette apoptose était liée à l'activation de la DAPk via sa déphosphorylation en absence de Nétrine-1.

D'autre part, la fonction de facteur de survie de la Nétrine-1 pour les cellules tumorales pulmonaires a été confirmée *in vivo* à l'aide d'un modèle de xénogreffe réalisé chez la souris *nude*. Nous avons réalisé deux séries de xénogreffes des lignées H358 (Nétrine-1 positive) et H460 (Nétrine-1 négative) chez la souris *nude* où nous avons comparé l'effet du peptide inhibiteur de la Nétrine-1 (DCC-5Fbn) avec du PBS ou bien l'effet du siRNA Nétrine-1 avec du siRNA Scramble. Nous avons observé que le peptide DCC-5Fbn tout comme le siRNA Nétrine-1 induisent une régression des tumeurs H358 (Nétrine-1 +++) et que cette régression est liée à l'apoptose des cellules tumorales (augmentation du marquage TUNEL sur des coupes de tumeurs H358 traitées ou contrôles). Au contraire, ni le siRNA Nétrine-1, ni le peptide DCC-5Fbn n'ont d'effet sur la croissance des tumeurs H460 (Nétrine-1 négative) et sur leur mortalité *in vivo*.

En conclusion, nous avons montré que la Nétrine-1 est surexprimée dans la plupart des cancers pulmonaires non-à-petites-cellules où elle joue le rôle de facteur de survie. Toutefois son taux d'expression n'a pu être corrélé avec l'aggressivité tumorale par l'analyse du grade et du type cellulaire tumoral. De manière intéressante, les hybridations *in situ* et les immunomarquages réalisés sur des coupes tumorales révèlent que la Nétrine-1 est transcrite dans les cellules épithéliales tumorales. Ces données suggèrent que les cellules tumorales produisent la Nétrine-1 de façon autocrine. Par ailleurs, les cancers du poumon se subdivisent en deux grandes catégories : les cancers du poumon à petites cellules qui sont traités par chimiothérapie et les cancers du poumon non-à petites-cellules qui sont généralement traités par chirurgie car ils répondent mal aux chimiothérapies. Ainsi, la caractérisation du rôle de facteur de survie de la Nétrine-1 pour les cellules tumorales de cancers pulmonaires non-à petites-cellules suggère que l'inhibition de la Nétrine-1 dans ces cancers pourrait être une nouvelle alternative thérapeutique.

Interference With Netrin-1 and Tumor Cell Death in Non–Small Cell Lung Cancer

Céline Delloye-Bourgeois, Elisabeth Brambilla, Marie-May Coissieux, Céline Guenebeaud, Rémy Pedeux, Virginie Firlej, Florence Cabon, Christian Brambilla, Patrick Mehlen, Agnès Bernet

Background Netrin-1 may promote colorectal and breast tumorigenesis, by inhibiting apoptosis induced by its dependence receptors, deleted in colorectal cancer (DCC) and uncoordinated-5-homolog (UNC5H). The status of netrin-1 and its receptors in non–small cell lung cancer (NSCLC) was unknown.

Methods The levels of netrin-1 and its receptors were analyzed in a panel of 92 NSCLC and 25 human lung cancer cell lines by quantitative reverse transcription–polymerase chain reaction and immunohistochemistry. In lung cancer cell lines that express netrin-1, the expression of netrin-1 was inhibited by using small interfering RNA (siRNA), or interference with netrin-1 was performed by treatment with a decoy recombinant DCC ectodomain protein (DCC-5Fbn). Cell death was monitored with a trypan blue exclusion assay or by measuring caspase-3 activity. The effect of netrin-1 interference on tumor growth was analyzed by DCC-5Fbn intratumoral or netrin-1 siRNA intraperitoneal injection in mice engrafted with lung cancer cell lines. All statistical tests were two-sided.

Results High levels of netrin-1 were found in 43 of the 92 NSCLC tumor samples (47%). Interference with netrin-1 in human lung cancer cell lines was associated with UNC5H-mediated cell death in vitro (percentage of cell death in untreated and in DCC-5Fbn–treated cells = 8% and 26%, respectively, difference = 18%, 95% confidence interval [CI] = 10% to 26%; $P = .049$) and with lung tumor growth inhibition and/or regression in xenografted *nude* mice (12 mice in DCC-5Fbn–treated group and 13 mice in control group). Mean volume of control and DCC-5Fbn–treated tumors on day 46 was 489 and 84 mm^3, respectively (difference = 404 mm^3, 95% CI = 145 to 664 mm^3; $P < .001$).

Conclusions Almost half of the NSCLC tissue samples examined expressed high levels of netrin-1. Extracellular targeting of the interaction between netrin-1 and UNC5H may be a promising therapeutic approach for NSCLCs that express netrin-1.

J Natl Cancer Inst 2009;101:237–247

Netrin-1, a diffusible laminin-related protein, has a major role in the control of neuronal navigation during development of the nervous system through interaction with its main receptors, deleted in colorectal cancer (DCC) (1–3) and uncoordinated-5-homolog (UNC5H), a group of the four UNC5H1, UNC5H2, UNC5H3, and UNC5H4 receptors (4,5). Recently, netrin-1, along with other neuronal guidance proteins like semaphorins, has also been shown to contribute to the patterning of developing epithelial tissues such as mammary gland, pancreas, and lung by regulating diverse processes including adhesion, motility, proliferation, and differentiation of cells in many non-neuronal tissues (6,7). Netrin-1 also regulates cell survival, and DCC and UNC5H receptors belong to the so-called dependence receptor family, whose members has a critical role in inducing cell death (8–10).

The dependence receptors induce cell death only when disengaged from their ligand(s), and this creates cellular states of dependence on the ligands (11,12). The molecular mechanisms used by these unbound receptors to trigger apoptosis are largely unknown. A common mechanistic feature appears to be cleavage of the receptors by caspases; this cleavage is required for cell death induction because it allows the exposure and/or release of a proapoptotic domain, which induces apoptosis (8,13), probably by interacting with proapoptotic proteins such as neurotrophin receptor–interacting MAGE homolog or the serine/threonine kinase, death-associated protein kinase (DAP-kinase) (14,15).

Affiliations of authors: Apoptosis, Cancer and Development Laboratory—Equipe labellisée 'La Ligue', CNRS UMR5238, Université de Lyon, Centre Léon Bérard, Lyon, France (CD-B, M-MC, CG, PM, AB); Lung Cancer Team, Institut Albert Bonniot, Inserm U823, Université Joseph Fourier, Pathology Department, Centre Hospitalier Universitaire, Grenoble, France (EB, RP, CB); CNRS FRE2944 Epigénétique et cancer, Institut André Lwoff, Villejuif, France (VF, FC).

Correspondence to: Patrick Mehlen, PhD, Apoptosis, Cancer and Development Laboratory—Equipe labellisée 'La Ligue', CNRS UMR5238, Université de Lyon, Centre Léon Bérard, 69008 Lyon, France (e-mail: mehlen@lyon.fnclcc.fr).

See "Funding" and "Notes" following "References."

DOI: 10.1093/jnci/djn491

© The Author 2009. Published by Oxford University Press. All rights reserved. For Permissions, please e-mail: journals.permissions@oxfordjournals.org.

CONTEXT AND CAVEATS

Prior knowledge

The availability of netrin-1, a ligand for proapoptotic dependence receptors, had been demonstrated to play a role in tumor survival in some cancers.

Study design

The expression of netrin-1 was measured in non–small cell lung cancers (NSCLC). The activity of netrin-1 and that of individual dependence receptors in cancer cells derived from NSCLCs was modulated using small interfering RNAs and other methods, and the effects of these modifications on apoptosis in vitro, and the growth in mice of tumors derived from these cells, were measured.

Contribution

This work demonstrated the presence of substantial levels of netrin-1 in a large fraction of human NSCLC tumor samples and suggested that the growth of some NSCLCs may depend on the interaction of netrin-1 and its dependence receptor(s).

Implications

Targeting netrin-1 or its dependence receptor(s) might represent a potential approach for treating NSCLC.

Limitations

These studies were confined to cell lines and animal models that may not be adequate models for NSCLC in humans.

From the Editors

The proapoptotic activity of these unbound receptors—so far mainly observed in vitro—has been suggested to be a mechanism for eliminating tumor cells that would develop when tumor cells proliferate in an environment with constant and limited ligand availability or migrate toward tissues devoid of ligand during the metastatic process. Losing the proapoptotic activity of their dependence receptors would be advantageous for the tumor cells' survival and could be achieved by at least three mechanisms. First, expression of the dependence receptor could be reduced. The existence of this mechanism is supported by the fact that the expression of DCC and UNC5H genes is reduced in many tumors (16–18) and that, in mice, inactivation of UNC5H3 leads to intestinal tumor progression (19). Second, downstream death signaling could be shut down. UNC5H2 proapoptotic activity relies on the binding of UNC5H2 to the DAP-kinase (15), a protein demonstrated to be involved in metastasis regulation and whose expression is reduced in human malignancies (20,21). The model described above predicts that a gain of netrin-1 expression would represent a third mechanism whereby survival of tumor cells would be enhanced. This third selective advantage has been observed in metastatic breast cancer (22), and the underlying mechanism may suggest potential therapeutic approaches because extracellular modulation of interaction between netrin-1 and its receptors may trigger tumor cell apoptosis and could be associated with inhibition of tumor growth.

Lung cancer is the leading cause of cancer-related deaths, and the worldwide incidence of adenocarcinoma appears to be increasing (23). Conventional therapeutics often have limited effect on lung cancer progression, and the overall 5-year survival is only 15% (24). We investigated whether a selective advantage for lung cancer cells due to alterations in netrin-1 dependence could be observed in this pathology by analyzing the netrin-1 level in a panel of human non–small cell lung cancer (NSCLC) cell lines and by determining whether interference with netrin-1 is associated with NSCLC cell death in vitro and tumor regression in a xenograft mouse model.

Patients, Materials, and Methods

Cell Lines, Transfection Procedures, and Reagents

Human lung cancer cell lines, including H358, H460, H322, H522, and H1435 cell lines, were cultured in RPMI 1640 Glutamax medium (Gibco; Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA) containing 10% fetal bovine serum. The A427 human cell line was cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (Gibco; Invitrogen) containing 10% fetal bovine serum. Human lung cancer cell lines were transfected by use of Lipofectamine reagent (Invitrogen) for plasmids or Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen) for small interfering RNA (siRNA). Netrin-1 was obtained from Apotech Corp./Axxora (Lausanne, Switzerland) and was used at a concentration of 150 ng/mL in all experiments presented. General caspase inhibitor z-VAD-fmk (benzyloxycarbonyl-VAD-fluoromethyl ketone) and specific caspase inhibitors DEVD-fmk (caspase-3), IETD-fmk (caspase-8), and LEHD-fmk (caspase-9) (R&D Systems, Minneapolis, MN) were, respectively, used at 1 and 10 μM.

Human Lung Tumor Samples

Frozen tissues, as well as paired tumor and distant normal lung tissues, were retrieved from the Tumor Bank. Tumors were classified according to histopathologic World Health Organization 2004 classification of lung tumors (25). Of 97 tissues analyzed, 92 samples were interpretable immunohistochemically including 45 adenocarcinomas and 47 squamous cell carcinomas. The 25 frozen samples that were used for mRNA extraction and quantitative reverse transcription–polymerase chain reaction (Q-RT-PCR) were required to contain more than 70% tumor cells. The use of all patients' tissues was according to French laws and regulations.

Plasmid Constructs, siRNA, and DCC-5Fbn Production

The dominant negative mutants for UNC5H (pCR-UNC5H2-IC-D412N) and DCC (pCR-DCC-IC-D1290N) have been previously described (8,9). Caspase-8 and caspase-9 dominant negative encoding constructs were previously described (22). The plasmid Ps974-DCC-5Fbn that allows bacterial expression of the fifth fibronectin type III domain of DCC was obtained by inserting a *Pst*I/*Bam*HI DNA fragment generated by polymerase chain reaction with the already described plasmid pDCC-CMV-S (8) as a template. DCC-5Fbn production was performed as follows. Briefly, BL21 cells were forced to express DCC-5Fbn by isopropyl B−D-1-thiogalactopyranoside induction, and the BL21 lysate was subjected to affinity chromatography with Flag-sepharose (Sigma, St Louis, MO). For cell culture use, scrambled and netrin-1 siRNAs were designed by Santa Cruz (Santa Cruz, CA) as a pool of three target-specific siRNAs of 20–25 nucleotides.

For use in mice, a single netrin-1 siRNA was produced (Sigma-Proligo, St Louis, MO).

Cell Death Assays

For cell death assays, 1.8×10^5 cells were cultured in medium without serum and were treated (or not) with DCC-5Fbn (0.5 µg/mL) or transfected with siRNA with Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Cell death was analyzed by trypan blue staining, as previously described (8). The extent of cell death was calculated as the percentage of trypan blue–positive cells in each cell population. Apoptosis was monitored by measuring caspase-3 activity as described previously (8), by use of the Caspase-3/CPP32 Fluorometric Assay Kit (Gentaure Biovision, Brussels, Belgium). Cell survival was also measured 48 hours after treatment with the Vybrant MTT (dimethylthiazol diphenyltetrazolium) assay kit (Molecular Probes; Invitrogen), in 2.0×10^4 cells that were treated (or not) with DCC-5Fbn (0.5 µg/mL) in 96-well plates, according to the manufacturer's instructions. For detection of DNA fragmentation on cryosections, terminal deoxynucleodityltransferase–mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL) was performed with terminal deoxynucleodityltransferase at 300 U/mL and 6 µM biotinylated dUTP (Roche Diagnostics, Meylan, France), as previously described (26).

Quantitative Reverse Transcription–Polymerase Chain Reaction

To assay netrin-1, DCC and/or UNC5H receptors, and DAPK1 expression in human lung normal and tumoral tissue and/or in lung cancer cell lines, total RNA was extracted from biopsy specimens and/or cells with the Nucleospin RNAII kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany), and 1 µg of RNA was reverse transcribed by use of the iScript cDNA Synthesis kit (Bio-Rad, Hercules, CA). Real-time Q-RT-PCR was performed on a LightCycler 2.0 apparatus by use of the LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I kit (Roche, Basel, Switzerland). Reaction conditions for optimal amplification and primer selection were determined as described above. The ubiquitously expressed human hypoxanthine–guanine phosphoribosyltransferase (HPRT), β-actin, and 18S and 28S ribosomal RNA genes, which showed the least variability in expression between normal and tumor lung tissues, were used as internal controls. The sequences of the primers are shown in Supplementary Table 1 (available online).

Immunohistochemistry

Xenograft tumors were embedded in 7.5% gelatin with 0.12 M sucrose, and 10-µm sections were prepared. For immunohistochemistry on H358 and H460 cells, 1.0×10^5 cells were centrifugated on cover slips with a cytospiner (Shandon Cytospin 3; Thermo Scientific, Waltham, MA). To block endogenous peroxidase activity, the slides were incubated in 2% hydrogen peroxide in phosphate-buffered saline (PBS). The slides were then incubated at room temperature for 1 hour with an antibody against human netrin-1 (dilution 1:200; R&D Systems), or cleaved human caspase-3 (dilution 1:250; Cell Signaling, Danvers, MA). After rinsing in PBS, the slides were incubated with a biotinylated secondary antibody conjugated to a streptavidin–peroxidase complex (Vectastain ABC; Vector Laboratories, Servion, Switzerland). Bound antibody was detected by use of 3,3-diamino benzidine.

For immunohistochemistry on lung tumor tissue samples, the anti-netrin-1 antibody (AB2 rabbit polyclonal antibody; Calbiochem, EMD Biosciences, San Diego, CA) was used at a 1:50 dilution on frozen tissue sections, which had been fixed with acetone. Secondary and tertiary antibodies were applied by use of Zymed Histostain Plus (Zymed Laboratories, San Francisco, CA). The immunostaining score was calculated by multiplying the percentage of positive tumor cells by an intensity value that could vary from 0 to 3, with 0 being no staining, 1 being weak staining, 2 being moderate staining, and 3 being strong staining. The immunostaining score could thus range from 0 to 300. A median score of 60 was used as the cutoff point for negative (score of <60) vs positive (score of ≥60) samples. Preabsorption of anti-netrin-1 antibody with a recombinant protein netrin-1 (provided by Calbiochem) was used as a control. Specificity of staining was also controlled by use of preimmune rabbit serum in place of netrin-1 antibody. Immunostaining scores were evaluated in blinded fashion.

In Situ Hybridization

Specific digoxigenin (DIG)-labeled sense and antisense RNA probes corresponding to human NTN1 complementary DNA (cDNA) were generated as described in the "DIG RNA Labeling Kit" (Roche). In situ hybridization was performed on 10-µm cryostat sections of normal and tumor tissue from the same patient. Briefly, fresh slides were fixed in 4% paraformaldehyde and then treated with 0.25% acetic anhydride in 0.1 M triethanolamine for 10 minutes. They were then dehydrated with a series of graded ethanol solutions, and hybridization was performed at 56°C for 15 hours. Slides were washed in saline–sodium citrate (SSC, 3 M NaCl, 0.3 M sodium citrate, pH 7) at 55°C, followed by a formamide wash at 55°C and SSC washes at 37°C. DIG-labeled RNA hybrids were reacted with alkaline phosphatase–conjugated anti-DIG antibodies (Roche). The reaction product was visualized by incubating the sections with nitro-blue tetrazolium chloride and 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate (Roche) overnight at room temperature.

Xenograft of Human Tumor Cells in *nude* Mice

Five-week-old (20–22 g [body weight]) female athymic nu/nu mice were obtained from Charles River. The mice were housed in sterilized filter-topped cages and maintained in a pathogen-free animal facility. H358 or H460 cells were implanted by subcutaneous injection of 5.0×10^6 cells in 200 µL of PBS into the left flank of the mice to make one tumor per mouse. When tumors reached a volume of approximately 60 mm^3 in approximately 5 days after injection, 20 µg of DCC-5Fbn in 35 µL (n = 12 H358-xenografetd mice and n = 4 H460-xenografted mice) or an equal volume of PBS (n = 13 H358-xenografetd mice and n = 4 H460-xenografted mice) was injected daily into the tumor for 25 days. In other experiments, 3 µg of siRNA targeting netrin-1 (n = 6 H358-xenografetd mice and n = 5 H460-xenografted mice) or scrambled siRNA (n = 6 H358-xenografetd mice and n = 5 H460-xenografted mice) was injected intraperitoneally each day for 14 days. Tumor sizes were measured with a caliper. The tumor volume was calculated with the formula $v = 0.5\ (l \times w^2)$, where v is volume, l is length, and w is width.

Statistical Analysis

The statistical significance of differences between groups was evaluated by the paired Student *t* test or the Mann–Whitney test. Mean values for all outcome variables are presented with 95% confidence intervals. Data presented are representative of at least three independent experiments. All statistical tests were two-sided, and *P* values less than .05 were considered to be statistically significant.

Results

Netrin-1 Expression in Human NSCLC Tumors

We first analyzed netrin-1 expression in a panel of 92 NSCLC tumors, including 45 adenocarcinomas and 47 squamous cell carcinomas, by immunohistochemistry with an antibody against netrin-1. Netrin-1 expression in normal bronchial and alveolar epithelial cells was absent or low (Figure 1, A), but both tumor types expressed high levels of netrin-1. Netrin-1 immunostaining was detected in the cytoplasm and in both apical and basal membranes, with 43 of the 92 NSCLC samples (47%) showing high netrin-1 staining. No statistically significant differences were observed in staining intensity between carcinomas at different stages (I–IV) (Supplementary Table 2, available online). Netrin-1 expression was more frequent and more intense in adenocarcinomas (60% of samples were positive, with a median score of 100) than in squamous cell carcinomas (34% positive samples with a median score of 50). In situ hybridization to detect netrin-1 mRNA identified a substantial level of netrin-1 mRNA in the epithelial tumor cells, but netrin-1 mRNA levels were undetectable or very low in the stroma cells, indicating that netrin-1 may be produced by tumor cells (Figure 1, B).

To quantify the expression of netrin-1 and its receptors, we determined the level of mRNAs encoding netrin-1 and its dependence receptors DCC, UNC5H1, UNC5H2, UNC5H3, and UNC5H4 by Q-RT-PCR in a panel of 25 lung carcinomas, including 14 adenocarcinomas and 11 squamous cell carcinomas, as well as in adjacent normal tissues that were at least 5 cm from the tumor. Netrin-1 expression was more than 4-fold higher in lung tumors than in adjacent normal tissue, with the mean number of netrin-1 cDNAs, relative to HPRT cDNAs, in tumor tissue being 23.65 and that in normal adjacent tissue being 5.00 (difference = 18.65, 95% confidence interval [CI] = 15.65 to 21.54, $P = .017$). Netrin-1 overexpression relative to normal tissue was observed in 19 of the 25 tumors (76%), with 13 (52%) of them showing more than a 3-fold increase in netrin-1 content relative to normal tissue. With the exception of one patient (data not shown), tumors overexpressing netrin-1 also expressed at least two of the netrin-1 dependence receptors. Mean DCC expression was decreased in 23 of the 25 tumors (92%), with the mean number of DCC cDNAs, relative to HPRT cDNAs, in tumor tissue being 3.72 and that in normal adjacent tissue being 16.25 (difference = 12.53, 95% CI = 10.31 to 14.75, $P < .001$), in agreement with previous results in lung cancer and other malignancies (27). At least two of the UNC5H receptors were always present in each tumor with high netrin-1 expression, but the levels of UNC5H receptors were not statistically significantly different between normal and tumor tissues (Figure 1, C).

We next screened 25 human NSCLC and small cell lung cancer cell lines for netrin-1 expression by Q-RT-PCR. Although some lung tumor cell lines had absent or low levels of netrin-1 expression, other lung cancer cell lines showed high netrin-1 expression (Supplementary Figure 1, available online). Two NSCLC cell lines, H358 and H460, that expressed different levels of netrin-1 were studied further. H358 cells were selected because of their relatively high level of netrin-1 expression, and H460 cells, with low level of netrin-1 expression, were picked as controls. Similar to the results in human tumor specimens, H358 cells expressed barely detectable levels of DCC receptor but higher levels of UNC5H receptors (Figure 1, D). To determine whether netrin-1 mRNA expression in H358 cells was associated with endogenous netrin-1 production, we determined the level of netrin-1 protein in H460 and H358 cells by use of immunohistochemistry with an antibody against netrin-1. Netrin-1–specific staining was detected in the cell membrane of most H358 cells (Figure 1, E), but no specific staining for netrin-1 was detected in H460 cells. Similar results were obtained with two other cell lines with high levels of netrin-1 mRNA (H322 and A427) and two cell lines with low levels of netrin-1 mRNA (H522 and H1435) (Supplementary Figure 1, B and C, available online). Thus, the high netrin-1 expression that we observed in NSCLC primary tumors was also found in some of the lung cancer cell lines examined.

Netrin-1 Autocrine Expression and Lung Tumor Cell Death

To investigate whether the netrin-1 expression observed in netrin-1–high cells is a selective advantage for survival, netrin-1 expression was reduced by RNA interference. Transfection of H358 cells with netrin-1 siRNA was associated with a reduction in netrin-1 mRNA of 58%, with the mean percentage of netrin-1 expression in scrambled siRNA–treated cells, compared with untreated cells, being 93% and that in netrin-1 siRNA–treated cells being 35% (difference = 58%, 95% CI = 52% to 63%, $P = .007$) (Figure 2, A). The reduction in expression was associated with a decrease in netrin-1 protein expression, as detected by immunohistochemistry (Figure 2, B). Although transfection of H358 cells with scrambled siRNA did not affect their survival, as measured by the trypan blue exclusion assay, netrin-1 siRNA transfection was associated with H358 cell death, with the percentage of cell death in untreated cells being 15%, that in scrambled siRNA–treated cells being 18%, and that in netrin-1 siRNA–treated cells being 40% (difference between scrambled siRNA– and netrin-1 siRNA–treated cells = 23%, 95% CI = 11% to 34%, $P = .007$) (Figure 2, C). In H460 cells, expressing low levels of netrin-1, survival was not affected by netrin-1 siRNA treatment (Figure 2, C). To determine whether this increase in cell death was due in part to induction of apoptotic cell death, caspase-3 activity was measured in response to netrin-1 siRNA treatment. As shown in Figure 2, D, apoptotic cell death was induced by netrin-1 siRNA treatment in H358 cells, with caspase-3 activity, normalized to that in untreated cells, being 0.96 in scrambled siRNA–treated cells and 2.44 in netrin-1 siRNA–treated cells (difference in apoptotic cell death between scrambled siRNA– and netrin-1 siRNA–treated cells = 1.48, 95% CI = 1.38 to 1.59, $P = .004$); this effect, however, was not observed in H460 cells. The simultaneous addition of recombinant netrin-1 to H358 cells fully reversed apoptosis induction observed after netrin-1

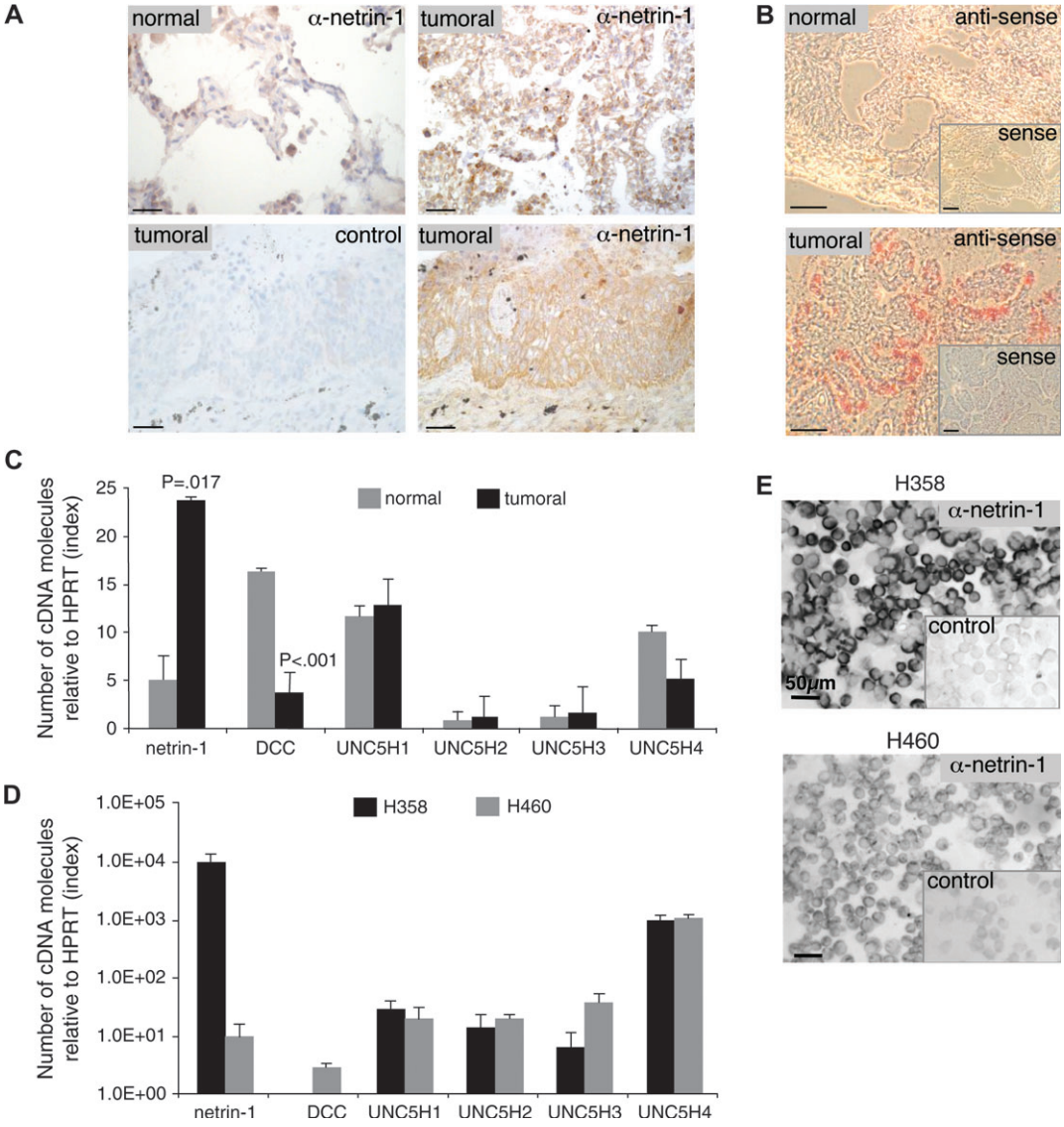


Figure 1. Netrin-1 expression in human non–small cell lung cancer tissue samples and lung cancer cell lines. **A**) Immunostaining for netrin-1. Sections from normal and tumoral lung (adenocarcinoma) tissues with an antibody against netrin-1 are shown in the **upper panels**. **Lower panels** show squamous cell carcinoma sections in the same area stained with a rabbit nonimmune immunoglobulin control (**left**) or with an antibody against netrin-1 (**right**). Note strong netrin-1–specific cytoplasmic- and membrane-based staining. Scale bar = 100 μm. **B**) In situ hybridization for netrin-1. Normal and tumor lung tissues were hybridized with an antisense netrin-1 probe or a control sense netrin-1 probe. Scale bar = 100 μm. **C**) Q-RT-PCR that was specific for netrin-1; DCC; and UNC5H1, -2, -3, and -4 was performed on total RNA from normal or tumor tissues from a total of 25 patients (14 adenocarcinomas and 11 squamous cell carcinomas). Mean number of cDNAs for each gene relative to HPRT cDNAs is presented. **Error bars** = upper 95% confidence intervals. *P* values were calculated with a two-sided Student *t* test. The comparison group is normal tissue. **D**) Expression analysis of netrin-1 and its receptors by Q-RT-PCR, using total RNA extracted from H358 and H460 cells with specific primers. Mean number of cDNAs for each gene relative to HPRT cDNAs is presented. **Error bars** = upper 95% confidence intervals. **E**) Immunostaining of human H358 and H460 cell lines with antibody against netrin-1. **Inset**: Staining obtained in the absence of primary antibody is also shown. Scale bar = 50 μM. cDNA = complementary DNA; DCC = deleted in colorectal cancer; HPRT = hypoxanthine–guanine phosphoribosyltransferase; Q-RT-PCR = quantitative reverse transcription–polymerase chain reaction; UNC5H = uncoordinated-5-homolog.

siRNA transfection, indicating a specific role for netrin-1 in H358 cell survival. Similar effects of netrin-1 siRNA treatment were obtained with two other cell lines that expressed high levels of netrin-1 (H322 and A427); this siRNA had no effect on netrin-1–low cell lines (H522 and H1435) (Supplementary Figure 2, A and B, available online).

We have recently shown that DCC-5Fbn, a 100 amino acid fragment of DCC, that contains the fifth fibronectin type III domain of DCC (Figure 3, A) affects the ability of netrin-1 to trigger multimerization of netrin-1 receptors and consequently inhibits the antiapoptotic effect of netrin-1 (22; F. Mille et al., unpublished). Addition of DCC-5Fbn to H358 cells triggered cell death, as measured by trypan blue exclusion assay, with the percentage of cell death in untreated cells was 8% and that in DCC-5Fbn-treated cells was 26% (difference = 18%, 95% CI = 10% to 26%, $P = .021$). When the the MTT was used, the percentage of cells surviving in untreated cells being 100% and that in DCC-5Fbn-treated cells being 51% (difference = 49%, 95% CI = 27% to 70%, $P = .021$), and when caspase-3 activity assay was used, the caspase-3 activity in DCC-5Fbn–treated cells normalized to that in untreated cells was 2.34 (difference = 1.34, 95% CI = 0.23 to 2.44, $P = .049$) (Figure 3, B to D). This cell death was related to netrin-1 expression because when H460 cells were used instead of H358 cells, DCC-5Fbn had no effect on these endpoints. Furthermore, addition of recombinant netrin-1 blocked the effect of DCC-5Fbn on cell death, as measured by the three assays mentioned above (Figure 3, B to D), and interleukin-3-receptor extracellular domain IL3R-EC (IL3R), a nonrelated recombinant protein of the same size and purified under the same conditions as DCC-5Fbn, failed to trigger H358 cell death (Figure 3, D). Similar results were obtained when two other netrin-1–high cell lines (H322 and A427) were used instead of H358 cells, and no cell death was observed in

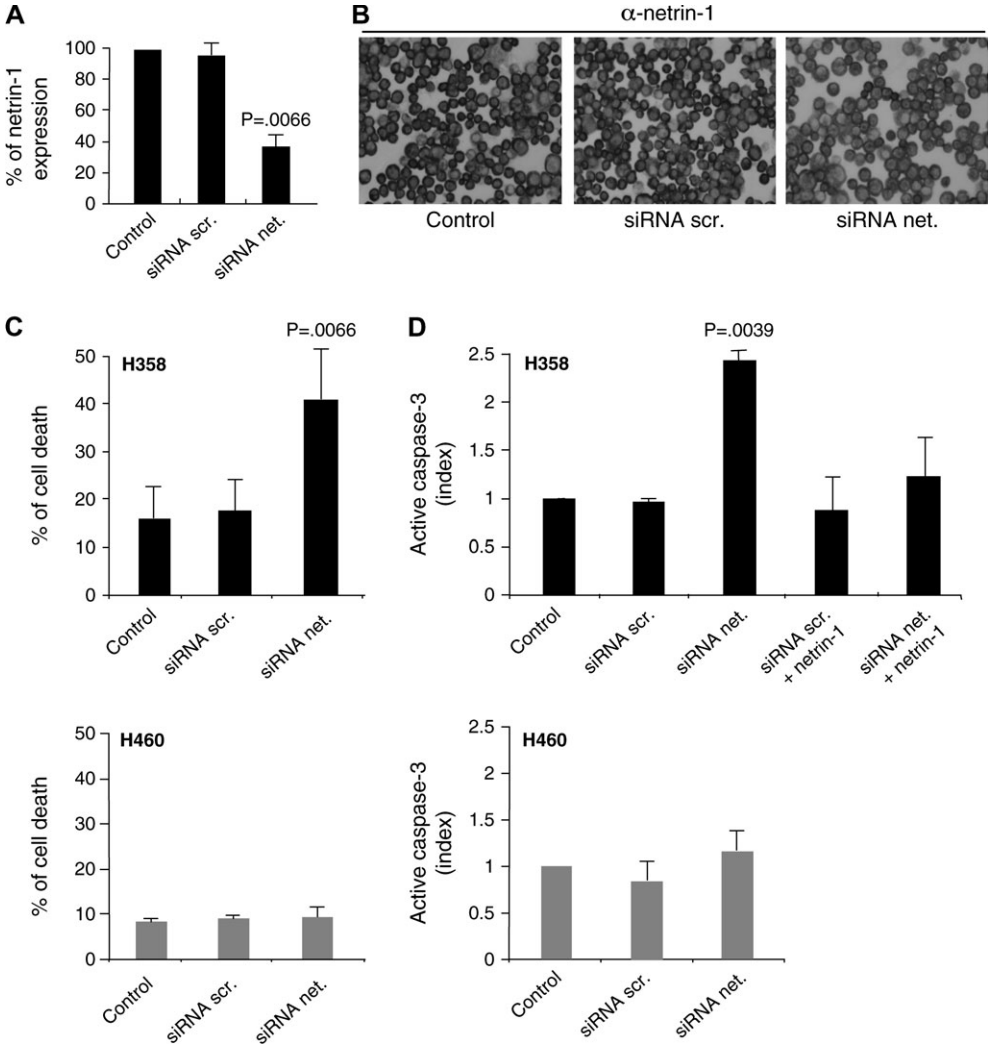


Figure 2. Netrin-1 inhibition by siRNA and cell death. **A**) Expression of netrin-1 was measured by quantitative reverse transcription–polymerase chain reaction in the H358 human lung cancer cell line not transfected (control) or 24 hours after transfection with scrambled siRNA (siRNA scr.) or with netrin-1 siRNA (siRNA net.). **B**) Immunostaining with antibody against netrin-1 in H358 cells without transfection (control) or H358 cells 24 hours after transfection with scrambled siRNA (siRNA scr.) or with netrin-1 siRNA (siRNA net.). The general caspase inhibitor z-VAD-fmk (benzyloxycarbonyl-valyl-alanyl-aspartyl fluoromethyl ketone) was added to avoid cell death induced by netrin-1 siRNA. (**C** and **D**) Cell death and netrin-1 siRNA. Cell death was quantified in H358 cells that express high levels of netrin-1 and in H460 cells that express low levels of netrin-1 after transfection with scrambled siRNA (siRNA scr.) or netrin-1 siRNA (siRNA net.). Nontransfected cells were the controls. **C**) Trypan blue exclusion assay. **D**) Assay for caspase-3 activity. In some experiments with H358 cells, exogenous netrin-1 was also added to assay the specificity of netrin-1 siRNA. Data are means of four independent experiments, each performed in duplicate. **Error bars** = upper 95% confidence intervals. *P* values were calculated with a two-sided Mann–Whitney test, and data were compared with the control level. siRNA = small interfering RNA.

two additional cell lines (H522 and H1435) with low levels of netrin-1 expression (Supplementary Figure 2, C, available online).

Involvement of UNC5H and DAP-Kinase in H358 Lung Cancer Cell Death Induced by Netrin-1 Inhibition

We hypothesized that H358 cell death induced by the inhibition of the netrin-1 autocrine loop with netrin-1 siRNA or DCC-5Fbn occurred through UNC5H receptors because DCC is barely detectable in lung cancer cells (Figure 1, D). To address this possibility, H358 cells were transfected with either a dominant negative mutant for DCC proapoptotic activity (DN DCC) or a dominant negative mutant for UNC5H proapoptotic activity (DN UNC5H), and cell death was analyzed in presence of either DCC-5Fbn or, as a control, the unrelated IL3R recombinant protein (IL3R). DN DCC expression failed to inhibit DCC-5Fbn–induced H358 cell death, with the percentage of cell death in DN-DCC–transfected cells in the presence of DCC-5Fbn being 34% and that in the absence of DCC-5Fbn being 16% (difference = 18%, 95% CI = 12% to 24%, P = .049). However, expression of DN-UNC5H rendered H358 cells resistant to DCC-5Fbn (Figure 4, A), indicating that UNC5H receptors are involved in DCC-5Fbn–induced cell death.

To determine which of the four UNC5H receptors initiated cell death in these cells, we targeted expression of each UNC5H—UNC5H1, UNC5H2, UNC5H3, or UNC5H4—with siRNA under conditions in which cell death was induced with netrin-1 siRNA. None of the individual UNC5H siRNAs inhibited netrin-1 siRNA–mediated H358 cells apoptosis, suggesting that more than one of the UNC5H receptors have a role in cell death in the absence of netrin-1 (Figure 4, B). In experiments that tested the effects of combinations of different siRNAs, we observed that a combination of siRNAs targeting UNC5H1 and UNC5H2 fully inhibited netrin-1 siRNA–mediated apoptosis (caspase-3 activity in cells treated with netrin-1 siRNA plus scrambled siRNA being 1.81 or plus UNC5H1 and UNC5H2 siRNAs being 1.02, normalized to caspase-3 activity in untreated cells [difference = 0.79, 95% CI = 0.54 to 1.04, P = .020]), whereas other combinations of two UNC5H siRNAs did not (Figure 4, C). Thus, in human non–small cell lung tumors, netrin-1–expressing lung cancer cells appear to increase their survival by inhibiting apoptosis induced by both UNC5H1 and UNC5H2 receptors.

To investigate the mechanism of cell death downstream of UNC5H receptors, we inhibited particular caspase activities. H358

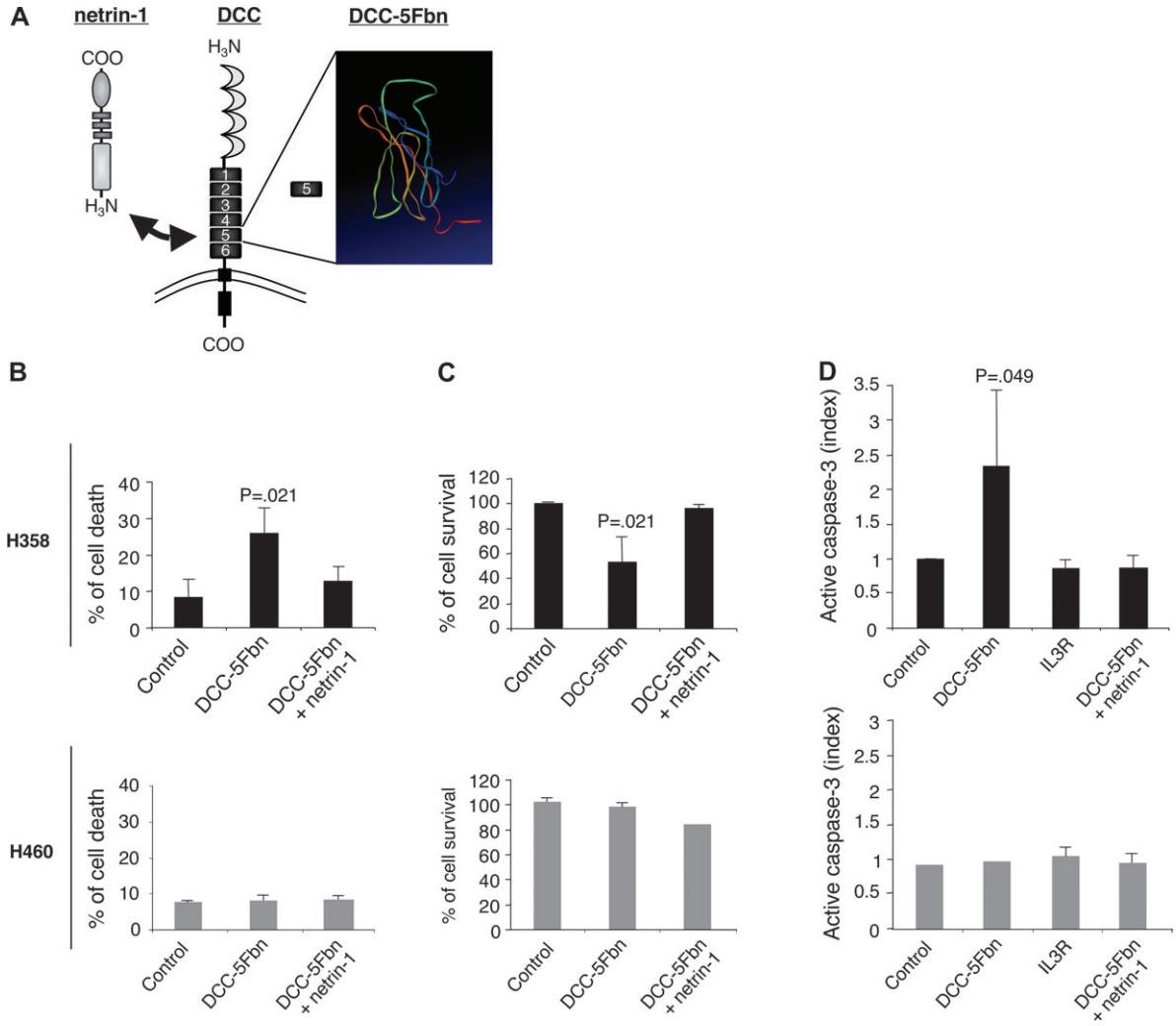


Figure 3. Netrin-1 autocrine loop disruption by a decoy receptor fragment and cell death. **A**) Schematic diagram showing the domains of netrin-1, its receptor DCC, and the backbone structure of the fifth fibronectin type III domain of DCC (DCC-5Fbn), predicted by nuclear magnetic resonance (http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=2EDD). (**B** to **D**) Quantitative analysis of cell death or survival in H358 and H460 cell lines treated with DCC-5Fbn, with or without addition of excess netrin-1 to reverse the effect of DCC-5Fbn. **B**) Trypan blue exclusion assay. **C**) MTT (dimethylthiazol diphenyltetrazolium) assay. **D**) Caspase-3 activity assay. Apoptosis was monitored by measuring relative caspase-3 activity in presence of DCC-5Fbn or of an unrelated interleukin-3 receptor extracellular domain IL3R recombinant protein produced in the same conditions as DCC-5Fbn. Data are means of three independent experiments, each performed in duplicate. **Error bars** = upper 95% confidence intervals. *P* values were calculated with a two-sided Mann–Whitney test, comparing treated samples with control. DCC = deleted in colorectal cancer.

cell death induced by netrin-1 siRNA treatment was blocked by expression of a dominant negative mutant of caspase-9 (Figure 4, D), but expression of a dominant negative mutant of caspase-8 did not reverse the effect of netrin-1 targeting (with caspase-3 activity) in scrambled siRNA–treated H358 cells being 0.82 and that in netrin-1 siRNA–treated cells in the presence of DNC8 being 2.21, normalized to caspase-3 activity in untreated cells ([difference = 1.38, 95% CI = 0.34 to 2.42, P = .049]). Furthermore, netrin-1 siRNA–induced H358 cell death was inhibited by treatment with the potent general caspase inhibitor (z-VAD-fmk) and also with the caspase-3 or caspase-9 inhibitors (respectively, DEVD-fmk and LEHD-fmk), but no such effect was observed using the caspase-8 inhibitor (IETD-fmk) (Supplementary Figure 3, available online). These observations are consistent with a requirement for caspase-9–dependent signaling in UNC5H-induced cell death (9).

It has previously been reported that UNC5H2 triggers caspase-9–dependent apoptosis via activation of DAP-kinase (15). We assayed for DAP-kinase activation after DCC-5Fbn treatment or netrin-1 siRNA transfection by determining whether these treatments were associated with changes in DAP-kinase autophosphorylation (DAP-kinase activation depends directly on its dephosphorylation) (28). DAP-kinase autophosphorylation was decreased after DCC-5Fbn treatment or netrin-1 siRNA transfection (Supplementary Figure 4, available online) but restored by a treatment with an excess of netrin-1 or by a combination of UNC5H1 and UNC5H2 siRNAs (Supplementary Figure 4, A, available online), indicating that the kinase is involved in the apoptotic pathway. DAPK1 gene expression was reduced in H460 cells (Supplementary Figure 4, B, available online), as previously reported (29), indicating that in these cells with low expression of netrin-1,

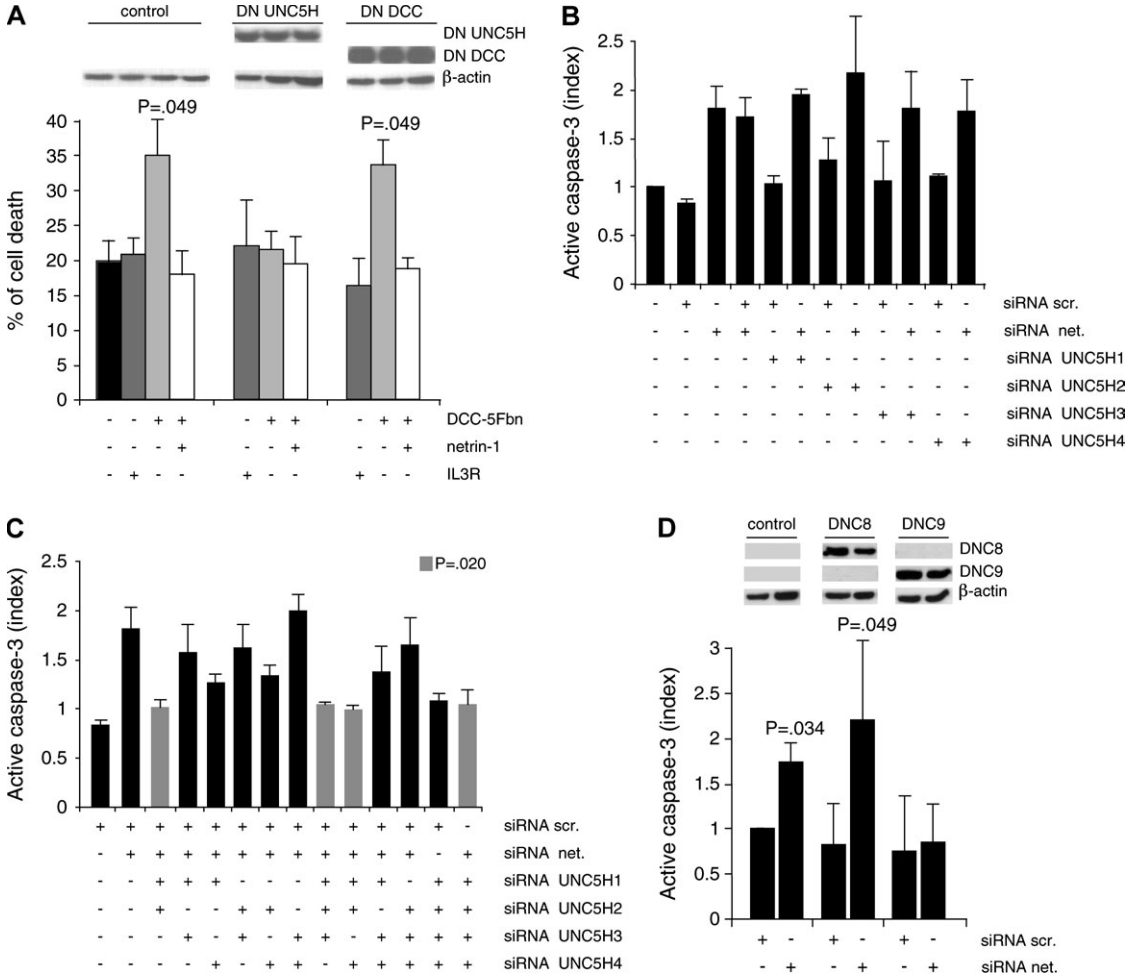


Figure 4. Requirement of UNC5H and downstream apoptotic signaling in H358 cell death induced by netrin-1 inhibition. **A**) Netrin-1 inhibition and cell death via UNC5H. H358 cells were transfected with a dominant negative mutant for DCC proapoptotic activity (DN DCC) or a dominant negative mutant for UNC5H proapoptotic activity (DN UNC5H). **Upper**: Western blots with anti-HA, anti-DCC, and anti-β-actin antibodies to detect DN UNC5H, DN DCC, and β-actin, respectively. **Lower**: Cell death. Trypan blue exclusion assay was used to measure cell death after treatment with DCC-5Fbn alone, with recombinant netrin-1 in excess to reverse the effect of DCC-5Fbn, or with an unrelated IL3R recombinant protein. (**B** and **C**) Requirement of UNC5H1 and UNC5H2 in cell death associated with netrin-1 inhibition. H358 cells were transfected with either scrambled siRNA or a netrin-1 siRNA plus one or more UNC5H siRNAs, and apoptosis was monitored by measuring caspase-3 activity. **B**) One UNC5H siRNA. **C**) Two to four UNC5H siRNAs. **D**) Requirement of caspase-9 in cell death associated with netrin-1 inhibition. H358 cells were transfected with a dominant negative mutant for caspase-8 (DNC8) or caspase-9 (DNC9) in combination with either scrambled siRNA (siRNA scr.) or netrin-1 siRNA (siRNA net.). **Upper**: Western blots with anti-HA and anti-β-actin antibodies to detect DNC8 and/or DNC9 and β-actin, respectively. **Lower**: Cell death quantified by a caspase-3 assay. Data are means of three independent experiments. **Error bars** = upper 95% confidence intervals. *P* values were calculated with a two-sided Mann–Whitney test; data were compared with the level of the control in panels (**A**) and (**D**) or with the level observed with netrin-1 siRNA in panels (**B**) and (**C**). DCC = deleted in colorectal cancer; siRNA = small interfering RNA; UNC5H = uncoordinated-5-homolog.

the inhibition of netrin-1 dependence receptor pathway occurs downstream in the UNC5H-mediated death signaling pathway.

In Vivo Effect of Netrin-1 Autocrine Loop Disruption on Lung Tumor Progression

To determine whether interference with netrin-1 triggers tumor cell death in vivo, H358 or H460 cells were used to generate xenograft tumors in nude mice. When tumors reached a volume of 60 mm^3, mice were treated daily by intratumor injection of either PBS (control) or 20 µg of DCC-5Fbn for 25 days, and tumor volumes were determined for a period of 46 (H358) or 30 (H460) days. DCC-5Fbn fully inhibited tumor growth in H358 xenograft tumors in mice, with the mean volume on day 46 of PBS-treated tumors being 489 mm^3 and that of DCC-5Fbn–treated tumors being 84 mm^3 (difference = 404 mm^3, 95% CI = 145 to 664 mm^3, $P < .001$). However, DCC-5Fbn had no statistically significant effect on H460-xenografted mice (Figure 5, A and B; Supplementary Table 3, available online). Moreover, 9 of the 12 H358 cell-derived tumors (75%) regressed and 3 of the 12 tumors (25%) were not detected 15 days after the end of DCC-5Fbn treatment (Figure 5, A; Supplementary Table 3, available online). Similar results were obtained when a siRNA approach was used. After engrafted tumors reached a volume of 60 mm^3, either scrambled or netrin-1 siRNA was injected intraperitoneally. The netrin-1 siRNA had no effect on tumor growth in mice with H460 xenograft tumors, but it fully inhibited tumor growth in mice with H358 xenograft tumors (mean tumor volume on day 22 of scrambled siRNA–treated mice being 427 mm^3 and that of netrin-1 siRNA–treated mice being 68 mm^3; difference = 359 mm^3, 95% CI = 141 to 577 mm^3, $P = .016$) (Figure 5, C).

To determine if the antitumor activity of DCC-5Fbn is associated with proapoptotic effects in vivo, we analyzed tumor cell death in mice carrying H358 or H460 xenograft tumors that had been treated (or not) with DCC-5Fbn for 15 days. Although the histology of DCC-5Fbn– and PBS-treated tumors was similar in mice carrying H460 tumors, a large central necrotic region was

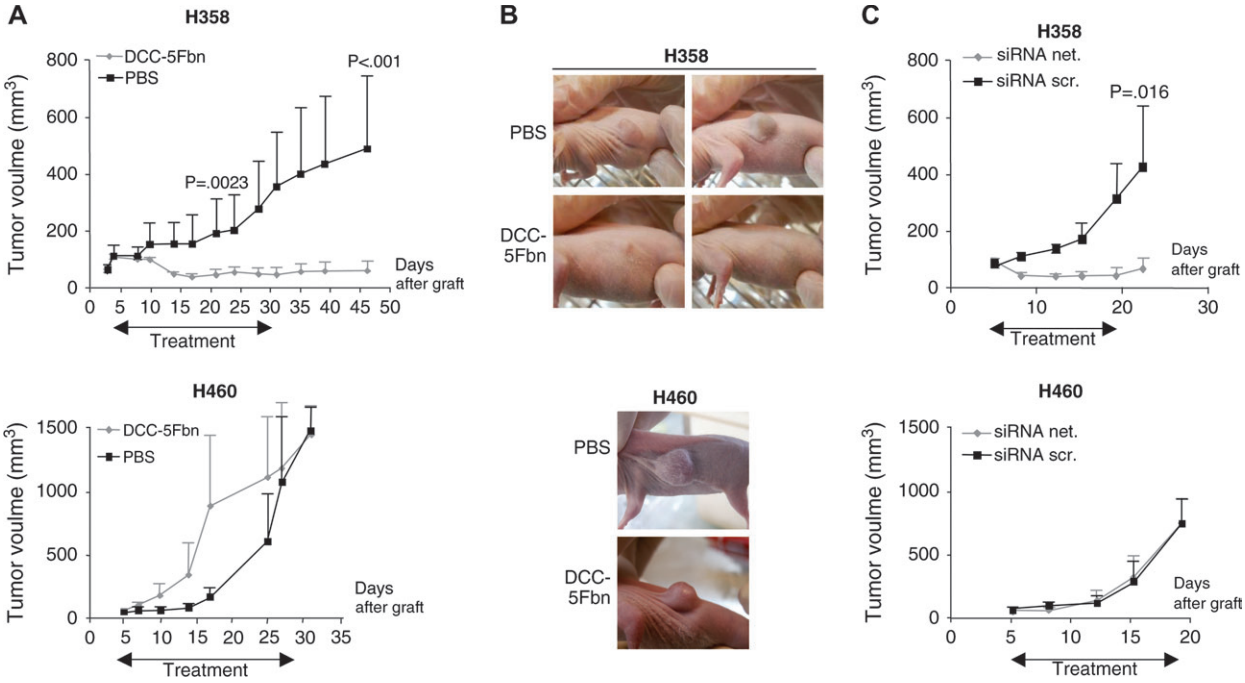


Figure 5. Effect of netrin-1 autocrine loop disruption on lung tumor growth in mice. **A**) Effect of the DCC fragment, DCC-5Fbn, on H358 xenograft lung tumor growth. The volume of palpable tumors derived from H358 (**upper**) or H460 (**lower**) cells was measured during and after intratumoral injection of either DCC-5Fbn (12 mice with H358 tumors and four mice with H460 tumors) or PBS (13 mice with H358 tumors and four with H460 tumors). Mean tumor volume is indicated. **Error bars** = upper 95% confidence intervals. *P* values correspond to a two-sided Student *t* test, compared with PBS-treated tumors on days 22 and 46. **B**) Photograph of tumor-bearing mice. **C**) Effect of netrin-1 siRNA on lung tumor growth. The volume of H358 (**upper panels**) or H460 (**lower panels**) xenograft tumors was measured during and after intraperitoneal injection of either netrin-1 siRNA (n = 6) or scrambled siRNA (n = 6). Mean tumor volume is indicated. **Error bars** = upper 95% confidence intervals. *P* values were calculated with a two-sided Mann–Whitney test, and data are compared with mean tumor volume in siRNA scr.–treated mice. DCC = deleted in colorectal cancer; PBS = phosphate-buffered saline; siRNA = small interfering RNA.

observed in tumors of DCC-5Fbn–treated mice carrying H358 xenograft tumors (Figure 6, A). To address the role of apoptosis in this antitumor effect, we used a TUNEL assay and detected active caspase-3 by immunostaining (Figure 6, A) on sections from tumors that had been treated with DCC-5Fbn or PBS. Although DCC-5Fbn had no effect on H460 tumor cell death, there was a statistically significant increase in apoptotic tumor cell death in H358 tumors. The increased apoptosis in DCC-5Fbn–treated H358 tumors was not only detected on tumors' cryosections (Figure 6, A) but also by direct measurement of caspase-3 activity in the tumors (Figure 6, B) (caspase-3 activity, normalized to that in PBS-treated tumors, in DCC-5Fbn–treated tumors = 2.54; difference = 1.54, 95% CI = 0.73 to 2.35, $P < .05$). Thus, DCC-5Fbn–induced tumor growth inhibition appears to be associated with increased tumor cell apoptosis.

Discussion

We provide here the first demonstration that a large fraction of primary NSCLC tumors overexpress netrin-1, the ligand of the dependence receptors DCC and UNC5H, and that this expression confers a selective advantage for tumor cell survival. We then propose that interference with netrin-1 could be an innovative anticancer strategy.

The dependence receptors' concept predicts that the fine balance between netrin-1 level and DCC and/or UNC5H level may control development, as well as adult tissue remodeling and homeostasis (7). We have demonstrated that the loss of this apoptosis-mediated regulatory function in the adult is involved in breast and intestinal tumor initiation and progression (22,30). Inhibition of apoptosis occurs by either a decrease in the levels of the receptors [eg, DCC and UNC5H expression is lost in the majority of colorectal cancers (17,19)] or overexpression of netrin-1.

We have recently demonstrated (22) that overexpression of netrin-1 confers a selective advantage for tumor cell survival in metastatic breast cancer, and Link et al. (31) have observed that netrin-1 overexpression is associated with worse outcome in poorly differentiated pancreatic adenocarcinomas. Similar to development of the mammary gland and the pancreas, lung development requires branching morphogenesis, and netrin-1 and its receptors have been proposed to have an important role during lung development, possibly by regulating branching (30,32,33). Thus, it may be worth noting that our results in lung tumor–cultured cell lines and in primary NSCLC tumors support the view that, rather than losing expression of netrin-1 receptors as observed in colorectal cancers, a large fraction of non–small cell lung tumors appear to overexpress netrin-1. It appears that the elevated netrin-1 level is a selective advantage acquired by lung cancer epithelial cells that permits them to escape apoptosis induced by netrin-1 dependence receptors and, consequently, to survive independently of netrin-1 availability. We found that UNC5H receptors were critical for netrin-1 dependence: DCC was often barely detectable in the

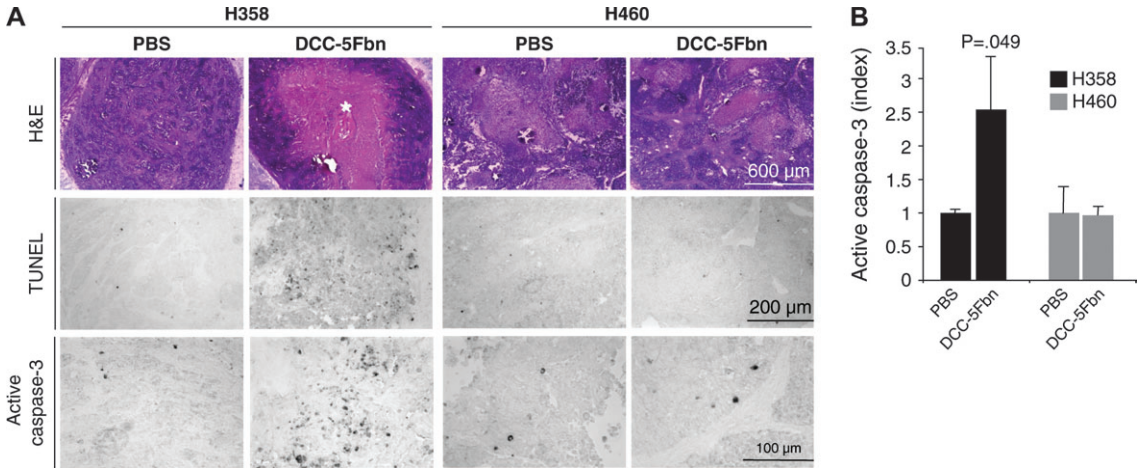


Figure 6. Effect of netrin-1 autocrine loop disruption on lung tumor histology and cell death in vivo. Cryosections were prepared from tumors from mice carrying H358 or H460 xenograft tumors that were treated for 15 days with either PBS or the DCC fragment DCC-5Fbn. **A**) Histology. **Top**: Hematoxylin–eosin staining. *Large necrotic lesion area in a DCC-5Fbn–treated H358-derived tumor. **Middle**: TUNEL. **Lower**: Anti-caspase-3 immunostaining. **B**) Quantification of apoptosis by caspase-3 activity assay on xenografts' lysates analyzed after 2 days of treatment (after the tumors reached a palpable size). Data are means of caspase-3 activities in three xenograft tumor lysates for each condition. **Error bars** = upper 95% confidence intervals. *P* values were calculated with a two-sided Mann–Whitney test, and data are compared with level in PBS-treated tumors. DCC = deleted in colorectal cancer; PBS = phosphate-buffered saline; TUNEL = terminal deoxynucleodityltransferase–mediated dUTP-biotin nick end labeling.

tested lung tumors, and ablation of both UNC5H1 and UNC5H2 in netrin-1–high H358 cells was sufficient to antagonize the proapoptotic stimulus generated by netrin-1 inhibition.

As predicted by the dependence receptor model, our results suggest that a lung tumor cell can escape the dependence receptor system in at least three ways: 1) through a decrease in the level of the receptors (16,17); 2) by inhibition of the downstream signaling pathways (the serine/threonine DAP-kinase, which mediates UNC5H-induced cell death, is also known to be frequently downregulated by promoter methylation in NSCLC) (34); and 3), as shown in this study, by endogenous expression of netrin-1. It is unclear why some breast tumors (22) and a large fraction of lung tumors overexpress netrin-1, but most colorectal tumors lose the receptors (only 7% of colorectal cancers show an increase in netrin-1 expression) (19,35). A possible explanation is that netrin-1 expression not only confers a gain in survival on the lung tumor cells but may also lead to enhancement of nonapoptotic signaling by netrin-1 receptors.

The role of netrin-1 in nonapoptotic signaling in the adult is not known with certainty. Netrin-1 was shown to bind a complex that includes some integrins (36), and thus, it is conceivable that netrin-1 overexpression triggers the activation of α6β4/α3β1 integrins expressed by lung epithelial cells. These integrins regulate cell migration and invasiveness and therefore may have a role in cancer progression (37). It is also possible that netrin-1 is an angiogenic factor that promotes tumor vasculature as netrin-1 was recently proposed to play a role in embryonic angiogenesis, although this hypothesis is controversial (38–41). Alternatively, because endogenous netrin-1 expression inhibits proapoptotic signaling by all dependence receptors, it may have more potent effects on survival than the loss of one or two netrin-1 receptors. At a genetic or epigenetic level, the decrease in the expression of dependence receptors occurs through loss of heterozygosity or promoter methylation (17,19,42); the mechanism allowing netrin-1 upregulation is unknown.

These observations provide not only evidence for the importance of ligand–dependence receptors pairs in the regulation of tumor development but also a new therapeutic strategy. Advanced NSCLC is the leading cause of cancer-related deaths in the world. Most patients with advanced NSCLC present with metastatic disease and have a median survival after diagnosis of 4–5 months in absence of treatment. Combination of cytotoxic chemotherapies results in a modest increase in survival. The development and clinical application of novel drugs that specifically target altered signaling pathways in this complex and heterogeneous disease are therefore required, and targeting netrin-1 may then be attractive.

Our study has, however, some limitations. It should indeed be noted that induction of apoptotic death in netrin-1–producing cells by interfering with netrin-1 is thus far restricted to human cell lines and animal models. Because these cells and these models fail to recapitulate the process of NSCLC in humans and its diversity, it is unclear whether a treatment based on interference with netrin-1 or other strategies based on preventing the interaction between netrin-1 and its receptors will be efficient alternative targeted strategies.

In conclusion, our findings raise the possibility that a targeted treatment that is based on inhibition of the interaction between netrin-1 and its dependence receptors might be of benefit to patients suffering from lung cancer whose primary tumors show high netrin-1 expression. Additional preclinical and clinical studies will be needed to determine whether anticancer treatments based on netrin-1–receptors interference represent viable alternative therapeutic approaches.

References

1. Serafini T, Colamarino SA, Leonardo ED, et al. Netrin-1 is required for commissural axon guidance in the developing vertebrate nervous system. *Cell.* 1996;87(6):1001–1014.
2. Keino-Masu K, Masu M, Hinck L, et al. Deleted in colorectal cancer (DCC) encodes a netrin receptor. *Cell.* 1996;87(2):175–185.

3. Forcet C, Stein E, Pays L, et al. Netrin-1-mediated axon outgrowth requires deleted in colorectal cancer-dependent MAPK activation. *Nature.* 2002;417(6887):443–447.
4. Ackerman SL, Kozak LP, Przyborski SA, Rund LA, Boyer BB, Knowles BB. The mouse rostral cerebellar malformation gene encodes an UNC-5-like protein. *Nature.* 1997;386(6627):838–842.
5. Hong K, Hinck L, Nishiyama M, Poo MM, Tessier-Lavigne M, Stein E. A ligand-gated association between cytoplasmic domains of UNC5 and DCC family receptors converts netrin-induced growth cone attraction to repulsion. *Cell.* 1999;97(7):927–941.
6. Cirulli V, Yebra M. Netrins: beyond the brain. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8(4):296–306.
7. Mehlen P, Furne C. Netrin-1: when a neuronal guidance cue turns out to be a regulator of tumorigenesis. *Cell Mol Life Sci.* 2005;62(22):2599–2616.
8. Mehlen P, Rabizadeh S, Snipas SJ, Assa-Munt N, Salvesen GS, Bredesen DE. The DCC gene product induces apoptosis by a mechanism requiring receptor proteolysis. *Nature.* 1998;395(6704):801–804.
9. Llambi F, Causeret F, Bloch-Gallego E, Mehlen P. Netrin-1 acts as a survival factor via its receptors UNC5H and DCC. *Embo J.* 2001; 20(11):2715–2722.
10. Tanikawa C, Matsuda K, Fukuda S, Nakamura Y, Arakawa H. p53RDL1 regulates p53-dependent apoptosis. *Nat Cell Biol.* 2003;5(3):216–223.
11. Mehlen P, Thibert C. Dependence receptors: between life and death. *Cell Mol Life Sci.* 2004;61(15):1854–1866.
12. Bredesen DE, Mehlen P, Rabizadeh S. Receptors that mediate cellular dependence. *Cell Death Differ.* 2005;12(8):1031–1043.
13. Mehlen P, Bredesen DE. The dependence receptor hypothesis. *Apoptosis.* 2004;9(1):37–49.
14. Williams ME, Strickland P, Watanabe K, Hinck L. UNC5H1 induces apoptosis via its juxtamembrane domain through an interaction with NRAGE. *J Biol Chem.* 2003;278(19):17483–17490.
15. Llambi F, Lourenco FC, Gozuacik D, et al. The dependence receptor UNC5H2 mediates apoptosis through DAP-kinase. *Embo J.* 2005; 24(6):1192–1201.
16. Thiebault K, Mazelin L, Pays L, et al. The netrin-1 receptors UNC5H are putative tumor suppressors controlling cell death commitment. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003;100(7):4173–4178.
17. Fearon ER, Cho KR, Nigro JM, et al. Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers. *Science.* 1990;247(4938):49–56.
18. Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell.* 1996;87(2):159–170.
19. Bernet A, Mazelin L, Coissieux MM, et al. Inactivation of the UNC5C netrin-1 receptor is associated with tumor progression in colorectal malignancies. *Gastroenterology.* 2007;133(6):1840–1848.
20. Inbal B, Cohen O, Polak-Charcon S, et al. DAP kinase links the control of apoptosis to metastasis. *Nature.* 1997;390(6656):180–184.
21. Raval A, Tanner SM, Byrd JC, et al. Downregulation of death-associated protein kinase 1 (DAPK1) in chronic lymphocytic leukemia. *Cell.* 2007;129(5):879–890.
22. Fitamant J, Guenebeaud C, Guix C, et al. Netrin-1 expression confers a selective advantage for tumor cell survival in metastatic breast cancer. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008;105(12):4850–4855.
23. Risch A, Plass C. Lung cancer epigenetics and genetics. *Int J Cancer.* 2008;123(1):1–7.
24. Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2007. *CA Cancer J Clin.* 2007;57(1):43–66.
25. Travis WD, Brambilla E, Muller-Hemerlink HK, Harris CC. *World Health Organization Classification of Tumors. Pathology and Genetics of Tumors of the Lung, Pleura, Thymus and Heart.* Lyon, France: IARC Press; 2004.
26. Ghoumari AM, Wehrle R, Bernard O, Sotelo C, Dusart I. Implication of Bcl-2 and Caspase-3 in age-related Purkinje cell death in murine organotypic culture: an in vitro model to study apoptosis. *Eur J Neurosci.* 2000;12(8):2935–2949.
27. Mehlen P, Fearon ER. Role of the dependence receptor DCC in colorectal cancer pathogenesis. *J Clin Oncol.* 2004;22(16):3420–3428.
28. Bialik S, Kimchi A. The death-associated protein kinases: structure, function, and beyond. *Annu Rev Biochem.* 2006;75:189–210.
29. Tang X, Wu W, Sun SY, Wistuba, II, Hong WK, Mao L. Hypermethylation of the death-associated protein kinase promoter attenuates the sensitivity to TRAIL-induced apoptosis in human non-small cell lung cancer cells. *Mol Cancer Res.* 2004;2(12):685–691.
30. Dalvin S, Anselmo MA, Prodhan P, Komatsuzaki K, Schnitzer JJ, Kinane TB. Expression of netrin-1 and its two receptors DCC and UNC5H2 in the developing mouse lung. *Gene Expr Patterns.* 2003; 3(3):279283.
31. Link BC, Reichelt U, Schreiber M, et al. Prognostic implications of netrin-1 expression and its receptors in patients with adenocarcinoma of the pancreas. *Ann Surg Oncol.* 2007;14(9):2591–2599.
32. Hinck L. The versatile roles of "axon guidance" cues in tissue morphogenesis. *Dev Cell.* 2004;7(6):783–793.
33. Liu Y, Stein E, Oliver T, et al. Novel role for Netrins in regulating epithelial behavior during lung branching morphogenesis. *Curr Biol.* 2004;14(10):897–905.
34. Yanagawa N, Tamura G, Oizumi H, et al. Promoter hypermethylation of RASSF1A and RUNX3 genes as an independent prognostic prediction marker in surgically resected non-small cell lung cancers. *Lung Cancer.* 2007;58(1):131–138.
35. Mazelin L, Bernet A, Bonod-Bidaud C, et al. Netrin-1 controls colorectal tumorigenesis by regulating apoptosis. *Nature.* 2004;431(7004):80–84.
36. Yebra M, Montgomery AM, Diaferia GR, et al. Recognition of the neural chemoattractant netrin-1 by integrins alpha6beta4 and alpha3-beta1 regulates epithelial cell adhesion and migration. *Dev Cell.* 2003;5(5):695–707.
37. Nikolopoulos SN, Giancotti FG. Netrin-integrin signaling in epithelial morphogenesis, axon guidance and vascular patterning. *Cell Cycle.* 2005;4(3):e131–e135.
38. Park KW, Crouse D, Lee M, et al. The axonal attractant Netrin-1 is an angiogenic factor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004;101(46):16210–16215.
39. Lu X, Le Noble F, Yuan L, et al. The netrin receptor UNC5B mediates guidance events controlling morphogenesis of the vascular system. *Nature.* 2004;432(7014):179–186.
40. Nguyen A, Cai H. Netrin-1 induces angiogenesis via a DCC-dependent ERK1/2-eNOS feed-forward mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006; 103(17):6530–6535.
41. Wilson BD, Ii M, Park KW, et al. Netrins promote developmental and therapeutic angiogenesis. *Science.* 2006;313(5787):640–644.
42. Carvalho AL, Chuang A, Jiang WW, et al. Deleted in colorectal cancer is a putative conditional tumor-suppressor gene inactivated by promoter hypermethylation in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 2006;66(19):9401–9407.

Funding

This work was supported by institutional grants from Centre Nationale de la Recherche Scientifique (to P.M.), Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (to E.B. and C.B.), Centre Léon Bérard (to P.M.), Université de Lyon (to P.M.) and from the Ligue Contre le Cancer (to P.M.), INCa (to P.M., E.B., and C.B.), Canceropole CLARA POC (to P.M.), ANR (to P.M.), and EC grants STREP Hermione and F4 ApoSys (to P.M.), PNES-INCa (to E.B. and C.B.) and PHRC Biomarkscan and Micromethods in pathology (to E.B. and C.B.).

Notes

The authors take full responsibility for the study design, data collection, analysis and interpretation of the data, the decision to submit the manuscript for publication, and the writing of the manuscript. P.M. and A.B. were co-senior authors for this article.

We thank Laurence David-Boudet for technical advice, C. Guix and J. Blachier for excellent technical help, J. G. Delcros for fruitful assistance with experiments, and H. Bilak and M. Susag for text correction.

Manuscript received May 5, 2008; revised November 17, 2008; accepted December 8, 2008.

Interference with netrin-1 triggers tumor cell death in Non Small Cell Lung Cancer

Céline Delloye et al.

Supplementary Tables 1-3

Supplementary Figures 1-4

Corresponding author: P. Mehlen; FAX (33) 4 78 78 28 87; e-mail: mehlen@lyon.fnclcc.fr

Supplementary table 1. List of primers used in the study.

Supplementary table 2. Netrin-1 expression in human NSCLC according to tumor stages.

Percent of tumors showing netrin-1 specific staining detected by immunohistochemistry in a panel of 92 NSCLC, according to cancer stages and proportion of tumor cells stained (from 97 tissues analyzed, 92 samples were interpretable with immunohistochemistry).

Supplementary table 3. Effect of DCC-5Fbn on lung tumor growth

Percent of H358 and H460-derived xenografts showing growth, growth arrest, partial regression or total regression after treatment with either PBS or DCC-5Fbn.

Supplementary figure 1. Netrin-1 and its receptors expression in human NSCLC cell lines.

A, Expression of netrin-1 by Q-RT-PCR using total RNA extracted from 25 different NSCLC (Non Small Cells Lung Cancer) and SCLC (Small Cells Lung Cancer) cell lines using HPRT housekeeping gene as a control. **B,** Expression analysis of netrin-1 and its receptors by Q-RT-PCR, using total RNA extracted from H322, A427, H522 and H1435 cell lines with specific primers, using HPRT housekeeping as a control. **C**, Immunostaining on human H322, A427, H522 and H1435 cell lines using netrin-1 antibody. Inset: Staining obtained in the absence of primary antibody is presented is also shown. Scale bar = 50μM.

Supplementary figure 2. Effect of netrin-1 autocrine loop disruption by siRNA or by a decoy receptor fragment on lung cancer cell lines.

A, Expression analysis of netrin-1 by Q-RT-PCR in the H322 and A427 human cell

lines not transfected (control) or 24h after transfection either with scramble siRNA (siRNA scr.) or with netrin-1 siRNA (siRNA net.). **B**, Cell death induction in H322 and A427 (netrin-1 high, upper panel) or H522 and H1435 (netrin-1 low, lower panel) cell lines was quantified in non transfected cells (control) or after transfection with either scramble siRNA (siRNA scr.) or netrin-1 siRNA (siRNA net.) using an assay for caspase-3 activity. **C**, Quantitative analysis of apoptotic cell death in H322, A427 (upper panel), H522, H1435 (lower panel) cell lines treated with DCC-5Fbn, with or without addition of netrin-1 in excess to reverse the effect of DCC-5Fbn, by measuring caspase-3 activity. An unrelated IL3R-EC peptide produced in the same conditions as DCC-5Fbn was used as a control. Data are means of three independent experiments with upper 95% confidence intervals.

Supplementary figure 3. Evaluation of caspase(s) involved in netrin-1 siRNA-induced H358 cell death.

H358 cells were transfected with either scramble siRNA (siRNA scr.) or netrin-1 siRNA (siRNA net.) and treated with caspase inhibitors z-VAD-fmk (general caspase inhibitor), DEVD-fmk (caspase-3 inhibitor), IETD-fmk (caspase-8 inhibitor) or LEHD-fmk (caspase-9 inhibitor). Cell death was quantified by caspase-3 assay. Data are means of three independent experiments with upper 95% confidence intervals. *P* values were calculated using a two-sided Mann-Whitney compared to level of siRNA scr. condition.

Supplementary figure 4. Effect of netrin-1 autocrine loop on DAP-Kinase pro-apoptotic signaling

A, Immunodetection of phosphorylated DAP-Kinase (Phospho-DAPK) and total DAP-kinase (DAPK) in H358 cells either treated with DCC-5Fbn (left panel) or transfected with netrin-1 siRNA alone or with UNC5H1 and H2 siRNAs (right panel). **B**, Expression

of *DAPK1* by Q-RT-PCR using total RNA extracted from H358 and H460 cell lines, using HPRT gene expression as a control.

Supplementary table 1

	Forward primer	Reverse primer
NTN1	5'-TGCAAGAAGGACTATGCCGTC-3'	5'-GCTCGTGCCCTGCTTATACAC-3'
UNC5A	5'-CATCACCAAGGACACAAGGTTTGC-3'	5'-GGCTGGAAATTATCTTCTGCCGAA-3'
UNC5B	5'-GGGCTGGAGGATTACTGGTG-3'	5'-TGCAGGAGAACCTCATGGTC-3'
UNC5C	5'-GCAAATTGCTGGCTAAATATCAGGAA-3'	5'-GCTCCACTGTGTTCAGGCTAAATCTT-3'
UNC5D	5'-GGTGAACCCAGCCTCCAGTCAG-3'	5'-CTTCCACTGACATCACTTCCTCCC-3'
DCC	5'-AGCCAATGGGAAAATTACTGCTTAC-3'	5'-AGGTTGAGATCCATGATTTGATGAG-3'
HPRT	5'-TGACACTGGCAAAACAATGCA-3'	5'-GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT-3'
β-actin	5'-CCTTCCTGGGCATGGAGTCCT-3'	5'-GGAGCAATGATCTTGATCTTC-3'
18S	5'-CGCCGCTAGAGGTGAAATTC-3'	5'-TTGGCAAATGCTTTCGCTC-3'
28S	5'-GGGTTTAGACCGTCGTGAGA-3'	5'-CCATGGCAACAACACTACAT-3'

Supplementary table 2

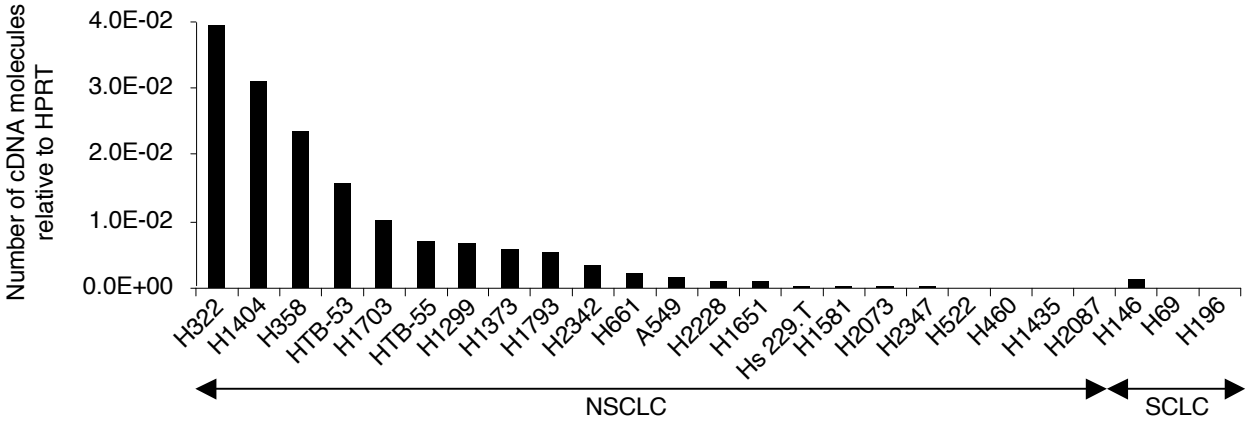
		% netrin-1-expressing tumor cells			
		0% (n=19)	10-40% (n=24)	50-70% (n=22)	80-100% (n=27)
Tumor stages	I (n=30)	17	17	30	36
	II (n=27)	27	27	23	23
	III-IV (n=35)	20	31	20	29

Supplementary table 3

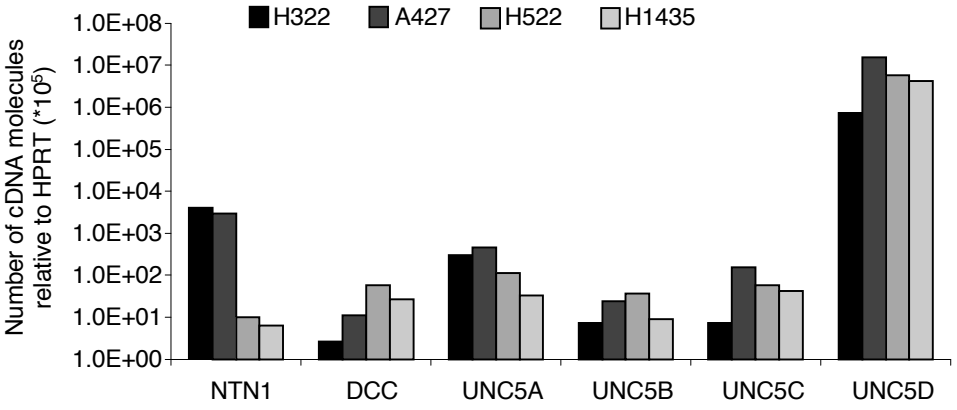
	H358		H460	
Treatment / Tumor Evolution	PBS (n=13)	DCC-5Fbn (n=12)	PBS (n=4)	DCC-5Fbn (n=4)
Growth	92% (n=12)	8% (n=1)	100% (n=4)	100% (n=4)
Growth arrest	8% (n=1)	17% (n=2)	0%	0%
Regression	0%	50% (n=6)	0%	0%
Total regression	0%	25% (n=3)	0%	0%

Supplementary figure 1

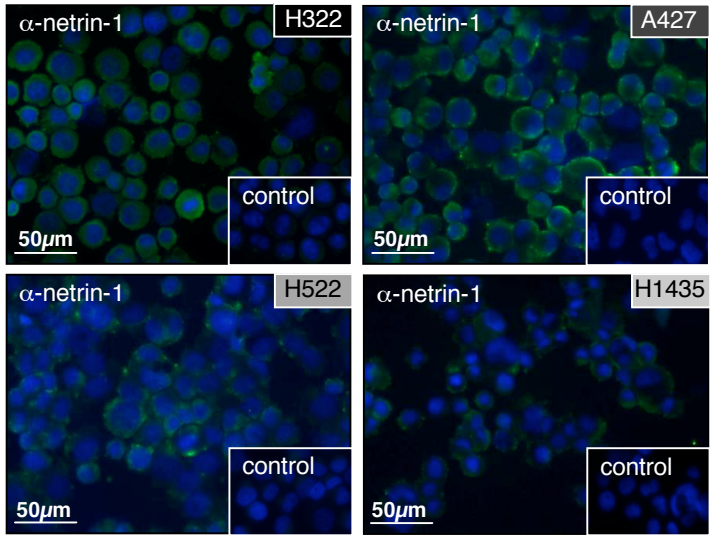
A



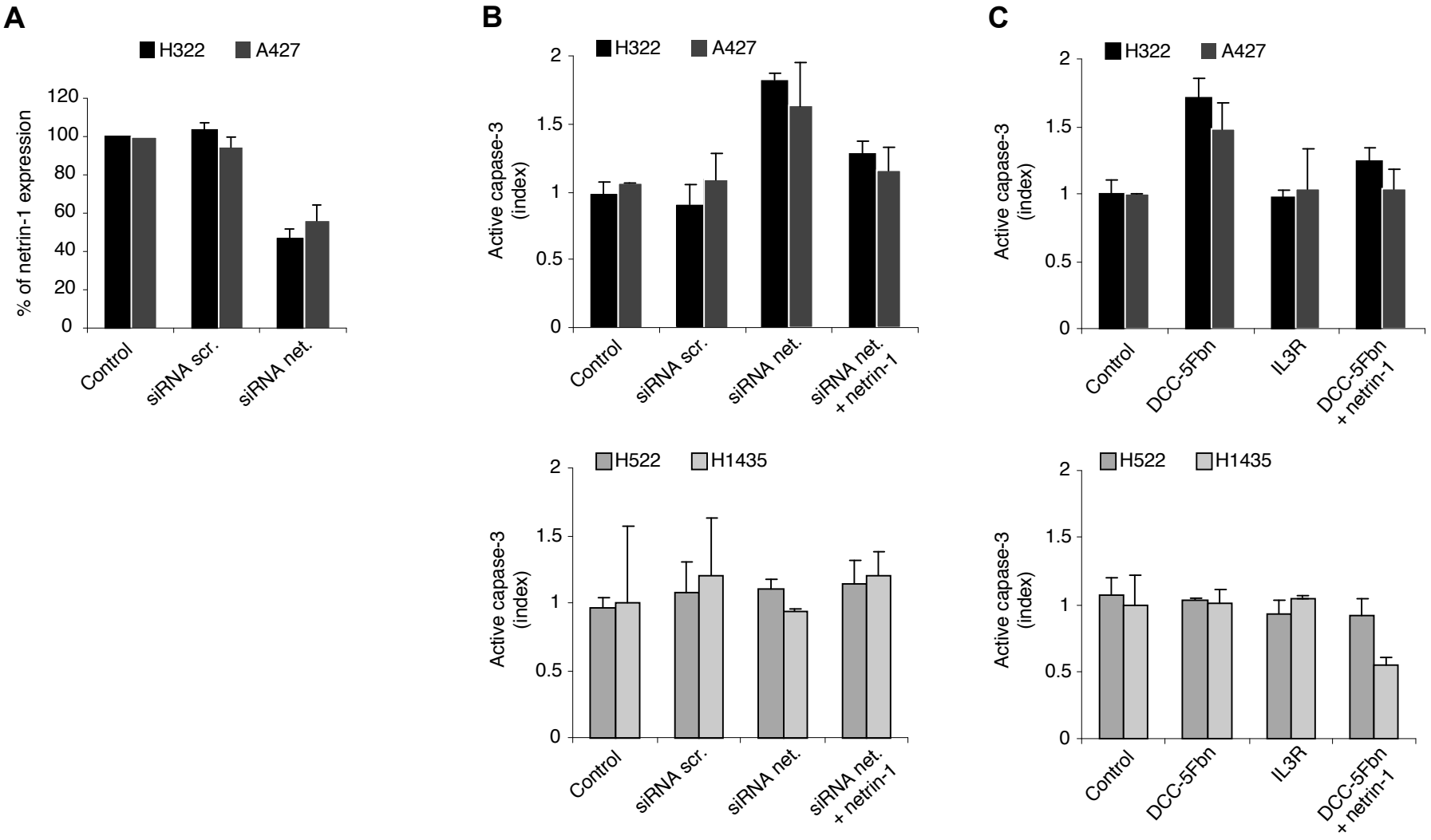
B



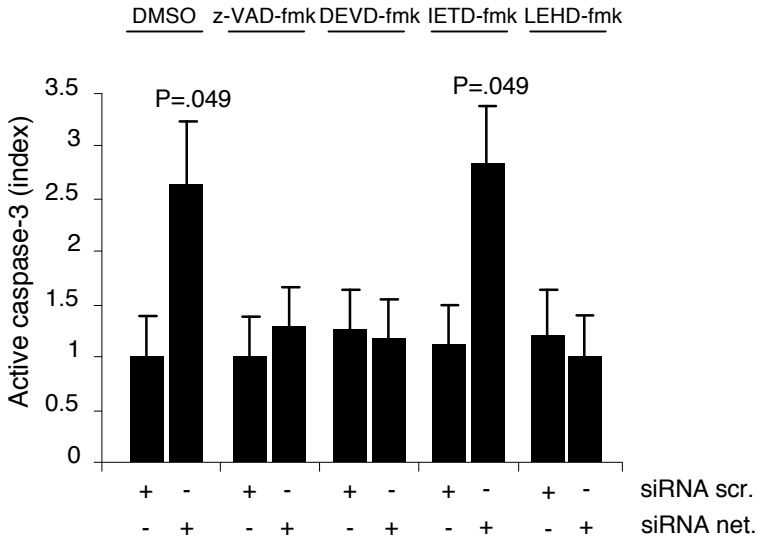
C



Supplementary figure 2

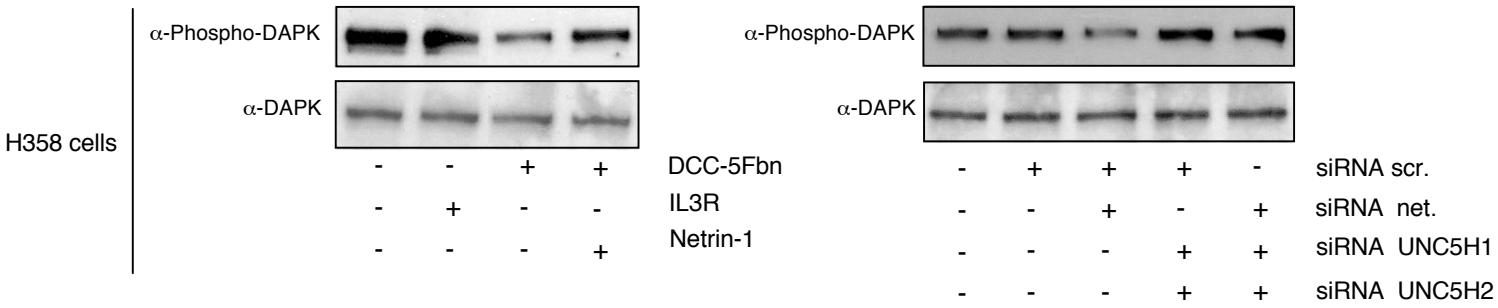


Supplementary figure 3

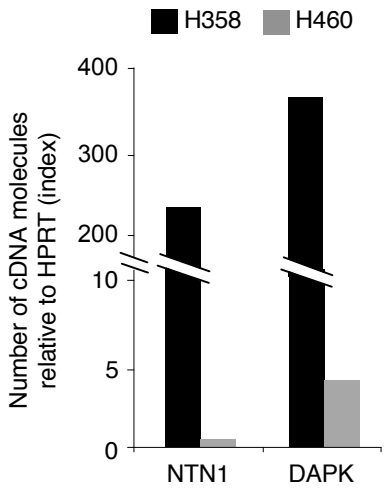


Supplementary figure 4

A



B



Partie II : Caractérisation des mécanismes moléculaires régulant la signalisation des récepteurs UNC5H

En parallèle des études sur la tumorigenèse et sur le développement d'une thérapie ciblée contre les cancers surexprimant la Nétrine-1, je me suis intéressée à la signalisation apoptotique des récepteurs UNC5H. J'ai ainsi d'une part participé à la caractérisation du rôle de l'oligomérisation des récepteurs UNC5H et DCC dans la régulation de leur signalisation et d'autre part à l'identification de nouveaux effecteurs pro-apoptotiques de la signalisation des récepteurs UNC5H.

Article 4 : Mécanisme d'induction de la mort des cellules tumorales Nétrine-1 dépendante par le peptide DCC-5Fbn.

Interfering with multimerization of netrin-1 receptors triggers tumor cell death

Mille F., Llambi F., Guix C., Delloye-Bourgeois C., Guenebeaud C., Castro-Obregon S., Bredesen DE., Thibert C., Mehlen P., Cell Death & Differentiation 2009

Pour induire la mort cellulaire, les récepteurs de mort s'oligomérisent en présence de leur ligand via leur domaine de mort. D'autre part, leur activité pro-apoptotique peut être inhibée par des récepteurs leurres (Decoy Receptor) capables de titrer leur ligand (en particulier TRAIL).

Nous avons voulu savoir si les récepteurs à dépendance UNC5H et DCC suivaient le même schéma en présence de Nétrine-1 et si le peptide DCC-5Fbn était capable de titrer la Nétrine-1 à la manière des récepteurs leurres ou bien s'il interférait différemment avec la signalisation positive médiée par la Nétrine-1 via ses récepteurs à dépendance.

Les premières expériences réalisées ont été des expériences de co-immunoprécipitation sur des cellules HEK293T exprimant des constructions UNC5H2 ou DCC fusionnées avec des séquences tags protéiques différentes. Il a ainsi été montré que les récepteurs UNC5H2 et DCC étaient capables d'homodimérisation, phénomène renforcé par l'ajout dans le milieu de culture ou la transfection de Nétrine-1.

Afin d'étudier le rôle fonctionnel de cette dimérisation sur la signalisation induite par les récepteurs DCC et UNC5H2 nous avons mis en place un système de dimérisation artificiel. Des constructions des récepteurs UNC5H2 et DCC fusionnés avec le domaine de dimérisation artificiel Fv2e ont été réalisées, ces protéines fusions étant capables de se

dimériser en présence de la molécule de synthèse AP20 formant un pontage chimique entre les domaines Fv2e. Nous avons co-transfecté dans des cellules HEK293T, traitées ou non avec la drogue AP-20, les constructions Fv2e-UNC5H2-HA et Fv2e-UNC5H2-Myc ou les constructions Fv2e-DCC-HA et Fv2e-DCC-Myc. Nous avons contrôlé par co-immunoprécipitation que la drogue AP-20 induisait bien une homodimérisation respective des récepteurs UNC5H2 et DCC et nous avons montré qu'elle était associée à la perte de la fonction apoptotique des récepteurs UNC5H2 et DCC.

Dans un deuxième temps, nous avons cherché à caractériser le mode d'action du peptide DCC-5Fbn ce dernier pouvant hypothétiquement restaurer l'apoptose des cellules tumorales surexprimant la Nétrine-1 via deux mécanismes : (i) l'inhibition de la fixation de la Nétrine-1 sur ses récepteurs UNC5H (le récepteur DCC n'étant pas exprimé dans les tumeurs et lignées tumorales analysées) ou bien (ii) l'inhibition du processus d'oligomérisation induit par la Nétrine-1.

Afin de savoir si le peptide DCC-5Fn était capable de lier la Nétrine-1 et de l'empêcher de se fixer sur ses récepteurs, nous avons dans un premier temps réalisé deux types de tests ELISA visant d'une part à vérifier que le peptide DCC-5Fbn interagissait directement avec la Nétrine-1 et d'autre part à voir si cette interaction était suffisante pour inhiber la fixation de la Nétrine-1 sur son récepteur DCC. Pour caractériser l'interaction entre la Nétrine-1 et le peptide, nous avons adsorbé dans les puits de plaque ELISA le peptide DCC-5Fbn (dose fixe) et nous avons ajouté de la Nétrine-1 recombinante à dose croissance. Après lavage, nous avons dosé la Nétrine-1 résiduelle présente dans chaque puits à l'aide d'un anticorps spécfique et nous avons réalisé la courbe de dissociation Nétrine-1/DCC-5Fbn qui nous a permis d'estimer la constante de dissociation de ce complexe à 5nM traduisant d'une forte affinité du DCC-5Fbn pour la Nétrine-1 (à titre comparatif, le Kd du couple Fas/FasL a été estimé à 7.4nM soit un ordre de grandeur similaire (Connolly et al., 2001)).

Le deuxième type de test ELISA que nous avons réalisé correspond à des ELISA de type « sandwich » visant à déterminer l'impact du peptide DCC-5Fbn sur une interaction pré-existante entre la Nétrine-1 et son récepteur DCC. Pour cela, nous avons adsorbé le domaine extracellulaire du récepteur DCC (DCC-EC-Fc) au fond des puits et nous avons pré-incubé de la Nétrine-1 dans ces puits (**figure IV**). Dans un deuxième temps, nous avons ajouté le peptide DCC-5Fbn soluble à des doses croissantes (**figure IV**) et après lavage nous avons dosé la quantité de Nétrine-1 résiduelle présente dans les puits. Nous n'avons pas observé de réduction du taux de Nétrine-1 fixée quelque soit la dose de peptide DCC-5Fbn ajoutée.

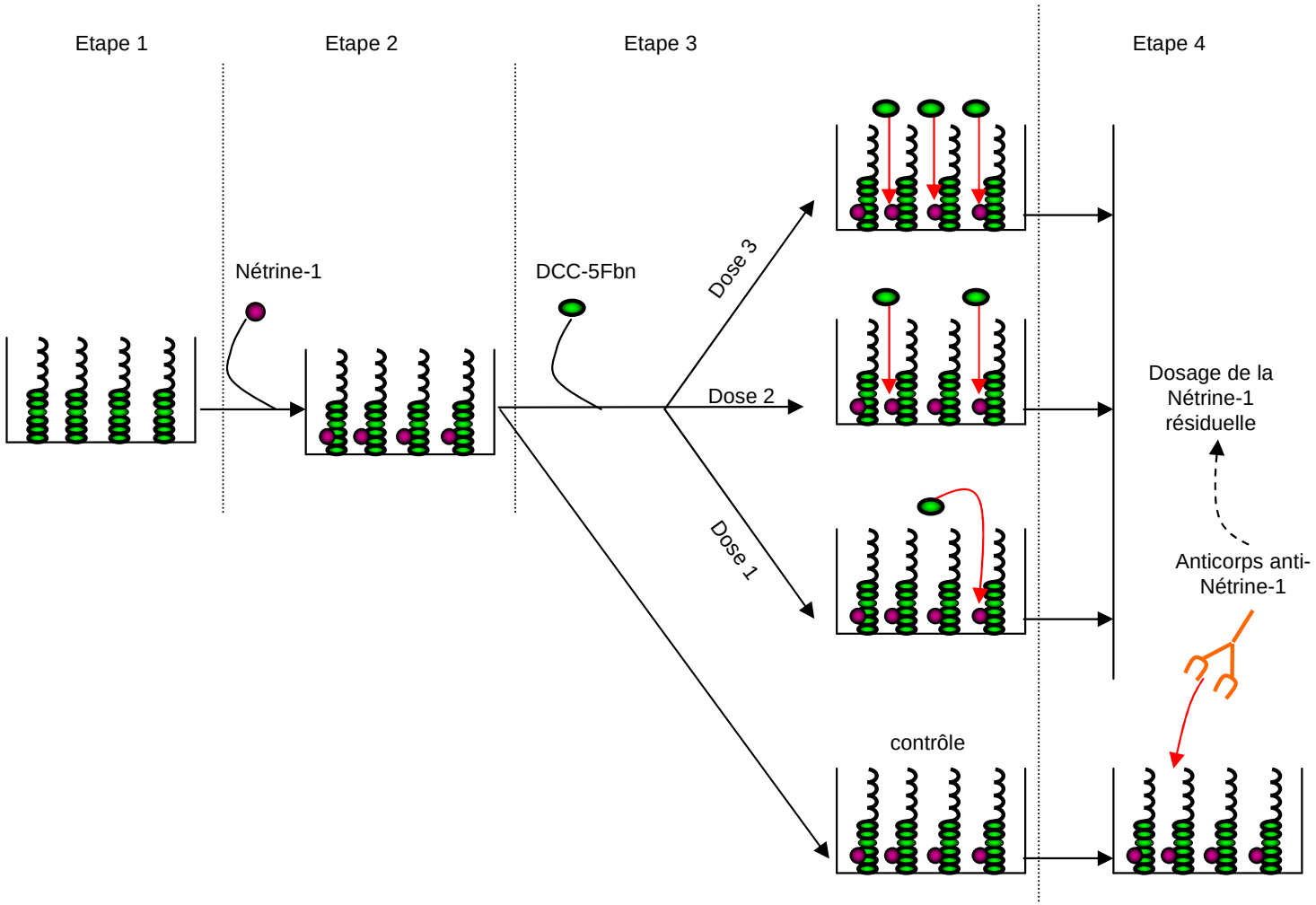


Figure IV. Schéma des ELISA sandwich comparant l'affinité du domaine extracellulaire de DCC et du peptide DCC-5Fbn avec la Nétrine-1.

Cette expérience consiste à adsorber au fond des puits le peptide DCC-Fc (étape 1) correspondant au domaine extracellulaire du récepteur DCC. Ensuite, de la Nétrine-1 à dose fixe (étape 2) puis du DCC-5Fbn à dose variable (étape 3) sont ajoutés successivement dans ces puits. Après lavage, la quantité de Nétrine-1 résiduelle est dosée (étape 4) dans les puits par l'utilisation d'un anticorps primaire anti-Nétrine-1(illustré pour la condition contrôle).

Ainsi, bien que le peptide DCC-5Fbn soit capable de lier la Nétrine-1, il n'est pas capable de perturber l'interaction pré-existante entre la Nétrine-1 et le récepteur DCC.

Nous avons donc cherché à savoir si l'induction de la mort cellulaire induite par le DCC-5Fbn sur des cellules Nétrine-1 dépendante était due à une inhibition de l'oligomérisation des récepteurs DCC ou UNC5H2. Pour cela, nous avons réalisé des expériences de co-immunoprécipitation qui nous ont permis de montrer que l'oligomérisation des récepteurs DCC observée en présence de Nétrine-1 était inhibée par le peptide DCC-5Fbn sur des cellules HEK293T.

En conclusion, nous avons montré que l'oligomérisation des récepteurs UNC5H2 et DCC observée en présence de Nétrine-1 était suffisante pour inhiber leur fonction pro-apoptotique *in vitro*. En outre, l'analyse de l'interaction du peptide DCC-5Fbn avec la Nétrine-1 ou avec le complexe Nétrine-1/DCC a permis de mettre en évidence le mécanisme d'action potentiel du peptide DCC-5Fbn pour induire la mort des cellules Nétrine-1 dépendante. En effet, il semble que le peptide soit capable d'induire la mort cellulaire non pas en titrant la Nétrine-1 et en inhibant sa fixation sur son récepteur DCC mais en inhibant l'oligomérisation du récepteur DCC indispensable à la survie cellulaire. Toutefois, dans les tumeurs mammaires et pulmonaires, il a été montré que l'expression du récepteur DCC est perdue et que la fonction de facteur de survie de la Nétrine-1 sur des lignées tumorales dérivées de ces deux tissus était médié par les récepteurs UNC5H. Ainsi, le mode d'induction de l'apoptose du peptide DCC-5Fbn sur les cellules tumorales exprimant fortement comme facteur de survie la Nétrine-1 reste à élucider. Néanmoins, cette étude révèle également de manière intéressante que le processus d'oligomérisation du récepteur UNC5H2 en présence de Nétrine-1 est un évènement suffisant pour inhiber l'apoptose induite par le récepteur UNC5H2, ce processus constituant ainsi une cible thérapeutique potentielle pour le développement de thérapie contre les cancers à surexpression de Nétrine-1.

Cell Death and Differentiation (2009) 16, 1344–1351
© 2009 Macmillan Publishers Limited All rights reserved 1350-9047/09 $32.00
www.nature.com/cdd

Interfering with multimerization of netrin-1 receptors triggers tumor cell death

F Mille[1,3], F Llambi[1,3], C Guix[1,3], C Delloye-Bourgeois[1], C Guenebeaud[1], S Castro-Obregon[2], DE Bredesen[2], C Thibert[1,4] and P Mehlen*[,1,4]

Netrin-1 was recently proposed to control tumorigenesis by inhibiting apoptosis induced by the dependence receptors DCC (Deleted in colorectal cancer) and UNC5H. Although the loss of these dependence receptors' expression has been described as a selective advantage for tumor growth and progression in numerous cancers, recent observations have shown that some tumors may use an alternative strategy to block dependence receptor-induced programmed cell death: the autocrine expression of netrin-1. This alternative strategy has been observed in a large fraction of aggressive breast cancers, neuroblastoma, pancreatic adenocarcinoma, and lung cancer. This observation is of potential interest regarding future targeted therapy, as in such cases interfering with the ability of netrin-1 to inhibit DCC or UNC5H-induced cell death is associated with apoptosis of netrin-1-expressing tumor cells *in vitro*, and with inhibition of tumor growth or metastasis in different animal tumor models. The understanding of the mechanism by which netrin-1 inhibits cell death is therefore of interest. Here, we show that netrin-1 triggers the multimerization of both DCC and UNC5H2 receptors, and that multimerization of the intracellular domain of DCC and UNC5H2 is the critical step to inhibit the proapoptotic effects of both of these receptors. Taking advantage of this property, we utilized a recombinant specific domain of DCC that (i) interacts with netrin-1 and (ii) inhibits netrin-1-induced multimerization, to trigger apoptosis in netrin-dependent tumor cells.
Cell Death and Differentiation (2009) **16,** 1344–1351; doi:10.1038/cdd.2009.75; published online 19 June 2009

Dependence receptors form a group of receptors that share the ability to induce cell death when expressed in settings in which their trophic ligands are unavailable.[1] The survival of cells that express such receptors is hypothesized to be dependent on the suppression of the receptor-mediated cell death by the receptors' ligands. This functional receptor family includes the common neurotrophin receptor p75^{NTR} [2] the GDNF receptor RET,[3] the Sonic Hedgehog receptor Patched,[4] some integrins,[5] the RGM receptor neogenin,[6] ALK,[7] the NT-3 receptor TrkC,[8] the EphrinB3 receptor EphA4[9] and the netrin-1 receptors, DCC[10] and UNC5H.[11]

Netrin-1 was initially discovered as a laminin-related molecule, produced by the floor plate, that attracts commissural axons as they migrate from the dorsal to the ventral spinal cord during the development of the nervous system.[12,13] It was predicted from genetic screens that the *Caenorhabditis elegans* netrin-1—UNC6—interacted with UNC40 and with UNC5.[14] Four orthologues of UNC5 were identified in mammals: UNC5H1, H2, H3, and H4; and UNC40 was found to be the orthologue of the vertebrate DCC (Deleted in Colorectal Cancer).[15] The *DCC* gene was initially discovered by Vogelstein and colleagues as a gene located in the minimal region of chromosome 18q, which is deleted in most colorectal cancers.[16,17] The fact that DCC expression is lost in the majority of colorectal cancers, but also in many other tumors, prompted it to be considered as a tumor suppressor gene.[16] However, although an initial series of reports supported the fact that DCC acted as a tumor suppressor (for a review, see Mehlen and Fearon[17]), doubts have arisen, mainly because of the rarity of point mutations in the DCC coding sequence and because of the lack of tumor predisposition in DCC hemizygous mice.[18] The observation that DCC is a dependence receptor and, as such, is able to trigger cell death in the absence of netrin-1 strengthened the initial hypothesis. Indeed, from this point of view, DCC would act as a tumor suppressor, limiting tumor development by inducing apoptosis of tumor cells that would otherwise proliferate in the environmental settings of netrin-1 absence.[19] Interestingly, the UNC5H netrin-1 receptors were also recently proposed to be tumor suppressors: UNC5H genes were shown to be downregulated in many cancers, especially in colorectal cancer,[20] and inactivation of UNC5H3 in mice is associated with intestinal tumor progression.[21] Moreover, ectopic expression of netrin-1 in the mouse intestine is associated with decreased apoptosis in the intestinal epithelium, as well as tumoral predisposition.[22] Thus, UNC5H (and probably DCC, as well) actually represent a novel class of tumor suppressors—conditional tumor suppressors—which suppress tumor formation in a milieu-dependent manner: in the absence of trophic support from netrin-1, they induce cell death and tumor

[1]Apoptosis, Cancer and Development Laboratory- Equipe labellisée 'La Ligue'- CNRS UMR5238, Université de Lyon, Centre Léon Bérard, Lyon 69008, France and [2]The Buck Institute for Age Research, Novato, CA 94945, USA
*Corresponding author: P Mehlen, Apoptosis, Cancer and Development Laboratory, Centre Léon Bérard-CNRS UMR5238, Université de Lyon, 28 rue Laennec, Lyon 69008, France. Tel: +334 787 828 70; Fax: +334 787 828 87; E-mail: mehlen@lyon.fnclcc.fr
[3]These authors contributed equally to this work
[4]Senior authors.
Keywords: apoptosis; dependence receptor; death receptor; netrin; DCC
Abbreviations: DCC, Deleted in colorectal cancer; CAM, chick chorioallantoic membrane; DCC-EC, complete extracellular domain of DCC
Received 06.1.09; revised 11.5.09; accepted 12.5.09; Edited by G Salvesen; published online 19.6.09

suppression; however, in the presence of high concentrations of netrin-1, they support tumor development.[19,22]

The tumor suppressive effects of UNC5H and DCC, coupled with the observation that their expression is decreased or lost in numerous cancers, raise the possibility that these may be therapeutic targets. Theoretically, tumor development and metastasis can be enhanced either by the loss of the proapoptotic effect of these receptors or by the gain of the ligand's antiapoptotic effect, and both strategies have been observed: in some cancer types–for example, colorectal cancer—netrin-1 receptors expression is lost or markedly decreased; in contrast, in a large fraction of other tumor types, such as metastatic breast cancer,[23] lung cancer,[24] neuroblastoma,[25] and pancreatic adenocarcinoma,[26] we and others have observed that netrin-1 is upregulated. This upregulation of netrin-1 has been shown to confer a selective growth advantage similar to that conferred by the loss of netrin-1 receptors.[23,24] Furthermore, this autocrine production of netrin-1 is a mechanism that lends itself more readily to therapeutic attack than does the receptor loss: indeed, we have found that its inhibition, either by inhibiting netrin-1 production through RNA interference or by extracellular titration of netrin-1, is associated with cell death *in vitro* and tumor growth/metastasis inhibition *in vivo*.[23,25] The search for compounds that may interfere with netrin-1's ability to block DCC/UNC5H-induced cell death is consequently of great potential for the development of alternative anticancer strategies.

The finding that the cognate ligands for DCC, UNC5H, and other dependence receptors block their cell death induction raises the question of how this is achieved mechanistically. DCC has been shown to homomultimerize in the presence of netrin-1, an important feature for the positive signaling of the receptor during axon guidance.[27] Because classic death receptors, such as TNFr or Fas, promote apoptosis in the presence of ligand by homomultimerization, and because dependence receptors have been suggested to mirror death receptors functionally,[28] we analyzed whether netrin-1-induced DCC and/or UNC5H multimerization is a critical step for DCC and/or UNC5H-mediated proapoptotic activity. We show here that DCC and/or UNC5H multimerize in response to netrin-1, and that this event is sufficient to inhibit apoptosis. We also demonstrate that a domain of DCC called DCC-5Fbn that triggers cell death *in vitro* and tumor inhibition in animal models[23,24] does so by interfering with netrin-1-induced multimerization.

Results and Discussion

To analyze whether DCC is primarily monomeric in the absence of netrin-1, we transiently co-expressed an HA-tagged full-length DCC together with Myc-tagged full-length DCC in HEK293T cells. Immunoprecipitation was then performed using an anti-Myc antibody, and as shown in Figure 1a, despite good expression of both HA and Myc-tagged DCC, DCC-HA was only modestly included in the DCC-Myc pull-down in the absence of ligand, suggesting that DCC was mainly present as a monomer when expressed in HEK293T in the absence of netrin-1. However, under the same experimental conditions, when netrin-1 was added to

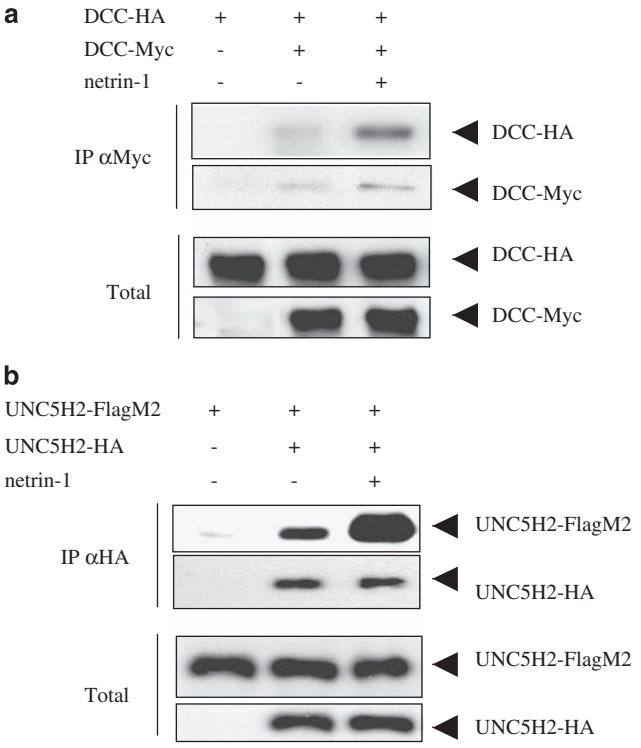


Figure 1 Netrin-1 mediates DCC and UNC5H2 multimerization. (**a**) DCC multimerization in the presence of netrin-1 in HEK293T cells. Lysates of HEK293T cells transiently transfected with DCC-HA and/or DCC-Myc expressing constructs treated or not with recombinant netrin-1 (300 ng/ml) were subjected to Myc pull-down (IP αMyc). DCC-HA presence was revealed with an anti-HA antibody. Immunoprecipitated DCC-Myc is also shown. As a control, DCC surface expression in the presence or absence of netrin-1 was analyzed by FACs analysis and showed no significant change (not shown). (**b**) UNC5H2 dimerization in the presence of netrin-1 in HEK293T cells. Cell transfection and cell lysate preparation were done as in (**a**) but with UNC5H2-HA and/or UNC5H2-Flag-expressing constructs. Cell lysates were subjected to HA pull-down (IP αHA). UNC5H2-Flag presence was revealed with an anti-Flag M2 antibody. Immunoprecipitated UNC5H2-HA is also shown. Total: western blot on lysate before pull-down

the culture medium (Figure 1a) or when a netrin-1 expression construct was co-expressed with the DCC-expressing constructs (not shown and Figure 3c), DCC-HA was clearly included in the DCC-Myc pull-down, demonstrating that netrin-1 triggers dimerization or multimerization of DCC. This result is in agreement with data from Tessier-Lavigne and colleagues,[27] who first reported netrin-1-induced multimerization, even though in our culture and immunoprecipitation conditions, DCC displayed a modest level of multimerization in the absence of netrin-1. This constitutive, low multimerization level could either be attributed to the low affinity of DCC receptors for themselves in the absence of ligand or to the system used, which is based on forced expression of high levels of transmembrane receptors.

We then investigated whether the other netrin-1 receptors, UNC5H, share a similar behavior. HEK293T cells were transiently transfected with an HA-tagged full-length UNC5H2 together with Flag-tagged full-length UNC5H2 in the presence or absence of netrin-1. Immunoprecipitation was then performed using an anti-HA antibody. As shown in Figure 1b, the presence of netrin-1 triggers an efficient immunoprecipitation of UNC5H2-Flag with UNC5H2-HA.

Thus, although in the absence of netrin-1, DCC and UNC5H2 are mainly monomeric, both DCC and UNC5H2 show an increased propensity to multimerize in the presence of netrin-1.

To determine whether netrin-1-induced multimerization is the crucial step for inhibiting DCC/UNC5H2 proapoptotic cell death, we developed a chimeric system in which protein dimerization can be induced by a chemical agent. This system was successfully used to show both the role of caspase-8 dimerization in caspase-8 activation[29] and the importance of $p75^{ntr}$-multimerization in blocking $p75^{ntr}$ proapoptotic activity.[28] This system is derived from the ability of the Fk1012 compound to cross-dimerize the FkBP motif. DCC and UNC5H2 intracellular domains were fused in their N-termini to derived Fv2e FkBP motifs, and dimerization was induced using the AP20187 chemical compound (Figure 2a). We first analyzed whether the developed system recapitulates netrin-1-induced multimerization of the UNC5H2 intracellular domain. HEK293T cells were co-transfected with an HA-tagged Fv2e-UNC5H2^{IC} together with Myc-tagged Fv2e-UNC5H2^{IC} and co-immunoprecipitations were performed using an anti-HA antibody. As shown in Figure 2b, without addition of AP20187, Fv2e-UNC5H2^{IC}-Myc was barely detectable in the Fv2e-UNC5H2^{IC}-HA pull-down, supporting the notion that Fv2e-UNC5H2^{IC} is expressed in HEK293T cells mainly as a monomer. As expected, the addition of AP20187 led to the efficient pull-down of Fv2e-UNC5H2^{IC}-Myc with Fv2e-UNC5H2^{IC}-HA. Similar results were obtained with Fv2e-DCC^{IC} (not shown). Thus, this dimerization system recapitulates the dimerization of the intracellular domain of the netrin-1 receptors DCC and UNC5H2.

Because this chemically inducible DCC/UNC5H2 dimerization system appears to work adequately to mimic netrin-1-induced DCC/UNC5H2 multimerization, we then assessed whether the dimerization of DCC/UNC5H2 was sufficient to inhibit DCC/UNC5H2 proapoptotic activity. HEK293T cells

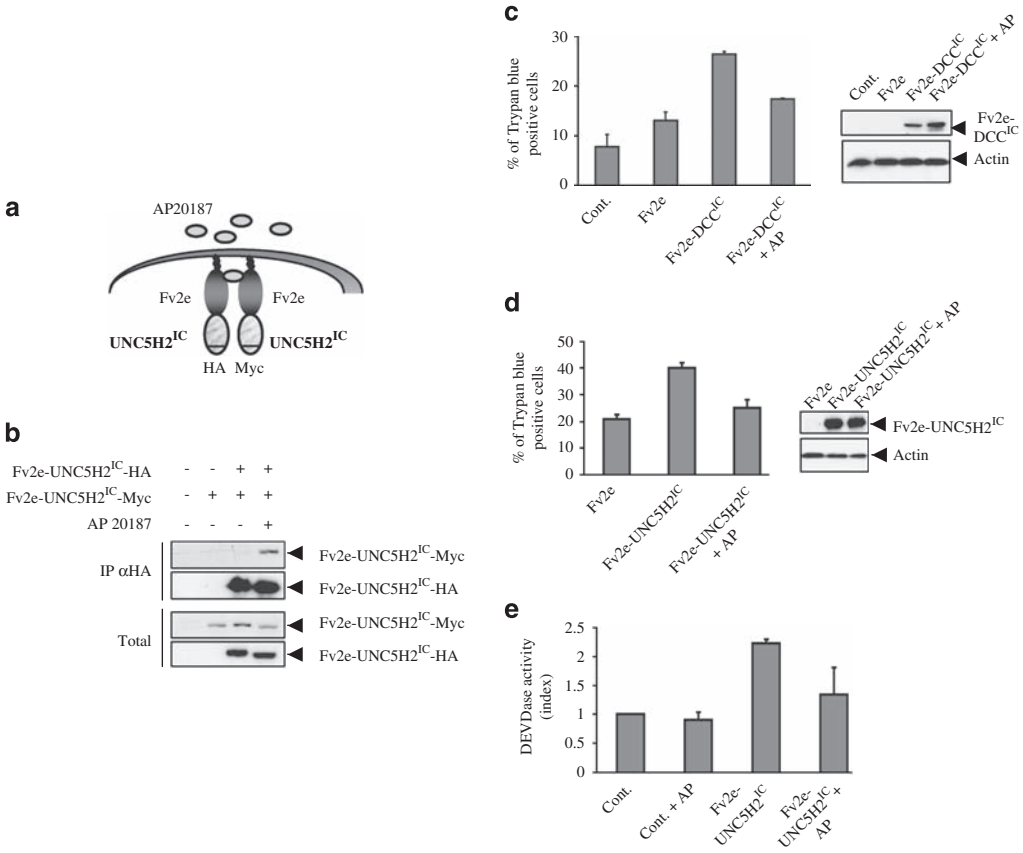


Figure 2 Forced DCC (vs UNC5H2) dimerization blocks DCC (UNC5H2) proapoptotic activity. (**a**) Schematic representation of Fv2e-UNC5H2^{IC} fusion constructions showing the two constructs (one tagged HA, the other one tagged Myc) used to validate the artificial dimerization system. (**b**) Lysates of HEK293T cells transiently transfected with Fv2e-UNC5H2^{IC} tagged HA or Myc with or without the dimerization drug (AP20187, 10 nM) were subjected to HA pull-down (IP αHA). Total: Western blot on lysate before pull-down. Fv2e-UNC5H2^{IC}-Myc presence was revealed with anti-Myc antibody. Immunoprecipitated Fv2e-UNC5H2^{IC}-HA is also shown. (**c**) DCC-induced cell death is inhibited by dimerization induced by AP20187, as measured by Trypan blue exclusion. HEK293T cells were transfected with mock plasmid (Cont.), Fv2e, Fv2e-DCC^{IC} with or without 10 nM AP20187 (AP). In all conditions, cells were also transfected with the surface marker pK^{k}. Transfected cells expressing the marker were magnetically labeled with MACSelect Microbeads and separated using a MACS Separator and Separation Columns. Trypan blue exclusion was assayed on these purified cells. A western blot was performed using anti HA antibody. Actin loading control is also shown. (**d**) UNC5H2-induced cell death is inhibited by dimerization induced by AP20187, as measured by Trypan blue exclusion as in (**c**). Cells were transfected with pMACSKk and Fv2e, Fv2e-UNC5H2^{IC} with or without AP20187 (AP). A western blot was carried out using anti-HA antibody. Actin loading control is also shown. (**e**) UNC5H2-induced caspase activation is inhibited by dimerization induced by AP20187, as measured by relative DEVDase activity. HEK293T cells were transfected with mock vector pCMV (Cont.), Fv2e, Fv2e-UNC5H2^{IC} with or without 10 nM AP20187 (AP). Index of relative caspase activity is presented as the ratio between the caspase activity of the sample and that measured in HEK293T cells transfected with pCMV. Standard deviations are indicated ($n = 3$)

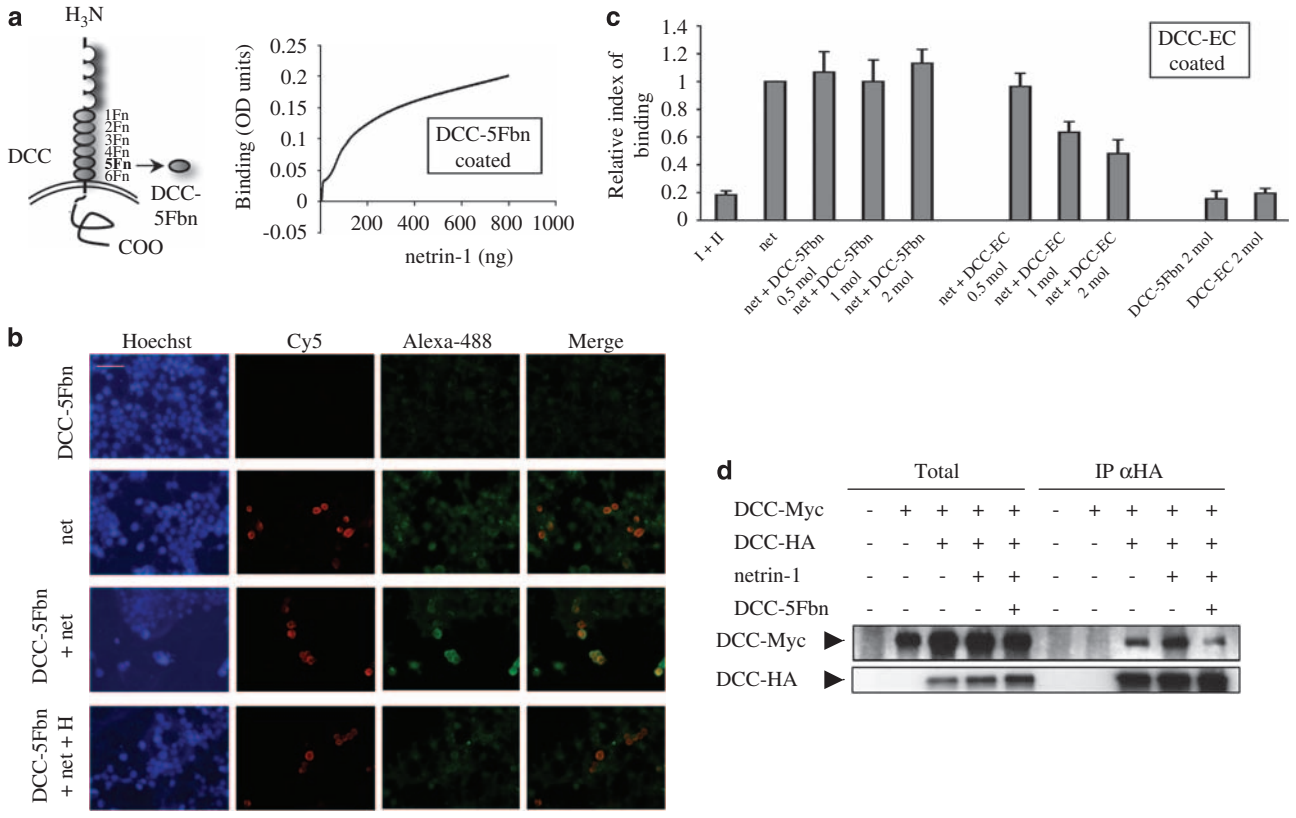


Figure 3 The recombinant soluble fifth fibronectin domain of DCC (DCC-5Fbn) inhibits netrin-1-induced DCC-multimerization. (**a**) Scheme showing DCC-5Fbn as one of the six fibronectin domain (Fn) of DCC. Affinity curve of netrin-1 on DCC-5Fbn measured by ELISA test shows that DCC-5Fbn is able to bind netrin-1. DCC-5Fbn (100 ng) or IL3-R (600 ng) was coated and increasing doses of netrin-1 were added (0–800 ng). The values obtained with IL3 were substracted from the one obtained with DCC-5Fbn. The approximate Kd of DCC-5Fbn/netrin-1 was estimated at 5 nM. (**b**) DCC-5Fbn colocalizes with secreted netrin-1. HEK293T cells were transfected or not with Myc-tagged netrin-1 and treated or not with FlagM2-tagged DCC-5Fbn (DCC-5Fbn) with or without addition of Heparinase (H). Addition of Heparinase disrupted DCC-5Fbn colocalization with netrin-1. Representative fields of netrin-1 immunohistochemistry (Cy5) and DCC-5Fbn (Alexa-488) are presented. Superimposed photographs (Merge) are shown. Hoechst staining shows cell nuclei. Scale bar represents 100 μM. (**c**) Competition assay. As in (**a**) but the complete extracellular domain of DCC (DCC-EC, 150 ng) was coated instead of DCC-5Fbn and netrin-1 (net) was added (50 ng) in the presence of increasing concentrations of either DCC-5Fbn or the complete DCC-EC. Note that DCC-5Fbn failed to compete with DCC/netrin-1 interaction. I + II (primary and secondary antibody), DCC-5Fbn 2 mol, DCC-EC 2 mol: controls performed in the absence of netrin-1. (**d**) Netrin-1-induced DCC multimerization is inhibited by DCC-5Fbn. Lysates of HEK293T cells transiently transfected with DCC-HA and/or DCC-Myc and/or netrin-1 (1/3 of total DNA) expressing constructs with or without DCC-5Fbn (900 ng/ml) were subjected to HA pull-down (IP αHA). DCC-Myc presence was revealed with anti-Myc antibody. Anti-HA immunoblot was also performed to detect DCC-HA precipitate. Total: western blot on lysate before pull-down

were forced to express Fv2e-DCC^{IC} in the presence or absence of AP20187, and cell death was assessed by Trypan blue staining, as previously described, to measure DCC-induced cell death.[10,30] As shown in Figure 2c, expression of Fv2e-DCC^{IC} was associated with increased cell death compared with the expression of the Fv2e motives without the DCC–IC fusion. Interestingly, when AP20187 was added, cell death induced by Fv2e-DCC^{IC} was reduced (Figure 2c). Similarly, although Fv2e-UNC5H2^{IC} triggered cell death (Figure 2d) and caspase activation (Figure 2e) when expressed in HEK293T in the absence of AP20187, the addition of the dimerizing drug was sufficient to reduce significantly Fv2e-UNC5H2^{IC}-induced cell death (Figure 2d) and caspase activation (Figure 2e). Thus, although monomeric DCC-IC and UNC5H2-IC were proapoptotic, the multimeric forms of DCC-IC or UNC5H2-IC did not display proapoptotic activity. Therefore, the ability of netrin-1 to inhibit DCC/UNC5H2 proapoptotic activity is intrinsically linked to the ability of netrin-1 to multimerize DCC or UNC5H2, as this multimerization process is sufficient to block DCC and UNC5H2 proapoptotic activity.

Although the mechanisms underlying netrin-1-induced receptor multimerization are yet to be described, the observation that netrin-1-induced DCC/UNC5H2 multimerization is sufficient to inhibit DCC/UNC5H2-induced cell death may represent an interesting tool to turn on DCC or UNC5H proapoptotic activity *in vivo,* in tumors expressing netrin-1 in an autocrine manner. Of relevance to this goal, we have demonstrated that netrin-1 overexpression in mouse gastrointestinal tract is associated with intestinal tumor development because of apoptosis inhibition,[22] and we and others have recently observed that netrin-1 is overexpressed in a large fraction of metastastic breast cancers,[23] lung cancer,[24] aggressive neuroblastoma,[25] and pancreatic cancers.[26] Therefore, the inhibition of DCC/UNC5H-induced dimerization might potentially represent a method to trigger tumor cell apoptosis.

To evaluate this possibility, we used the fifth fibronectin domain of DCC, which has been shown to be a domain of interaction with netrin-1 (Figure 3a and Geisbrecht *et al.*[31]), even though conflicting data have also been reported.[32] We

thus first assessed whether a recombinant soluble fifth fibronectin domain of DCC (DCC-5Fbn) could bind to recombinant netrin-1. ELISA assay demonstrated that DCC-5Fbn specifically binds to netrin-1, as opposed to the extracellular domain of an unrelated receptor, IL3-R (Figure 3a). The approximate Kd for DCC-5Fbn/netrin-1 was estimated to be approximately 5 nM, in keeping with the order of magnitude of the described DCC/netrin-1 Kd. To further analyze the specificity of the DCC-5Fbn interaction with netrin-1, we next performed a colocalization study of netrin-1 with DCC-5Fbn in netrin-1 transfected HEK293T cells. Although netrin-1 is known to be secreted, a large fraction is bound to the plasma membrane probably because of its binding to heparin.[12] Of interest, netrin-1 and DCC-5Fbn nicely colocalize at the plasma membrane but both netrin-1 and DCC-5Fbn immunostaining disappear upon heparinase treatment (Figure 3b). Thus, DCC-5Fbn specifically interacts with secreted netrin-1. We next investigated whether this domain was sufficient to displace DCC/netrin-1 interaction. As shown in Figure 3c, using an ELISA assay in which the extracellular domain of DCC was coated and netrin-1/DCC interaction was detected by netrin-1 immunoreactivity, we observed that, while as a positive control, the complete extracellular domain of DCC (DCC-EC) was sufficient to displace DCC/netrin-1 interaction, DCC-5Fbn failed to interfere. Thus, DCC-5Fbn interacts with netrin-1 but is not sufficient to inhibit DCC/netrin-1 interaction. We next investigated whether DCC-5Fbn could influence DCC multimerization. We performed co-immunoprecipitation in HEK293T transiently transfected with HA-tagged full-length DCC together with Myc-tagged full-length DCC in the presence or absence of netrin-1. As shown in Figure 3d (also in Figure 1a), the presence of netrin-1 triggered the immunoprecipitation of DCC-Myc with DCC-HA, demonstrating netrin-1-induced DCC multimerization. However, when the cells incubated with netrin-1 were also simultaneously treated with DCC-5Fbn, the DCC-HA/DCC-Myc interaction returned to netrin-1 untreated levels (Figure 3d). Thus, DCC-5Fbn interacts with netrin-1 and inhibits netrin-1-induced DCC-multimerization.

We therefore tested whether the ability of DCC-5Fbn to inhibit netrin-1-induced DCC-multimerization could trigger apoptosis in cells expressing netrin-1 and its receptors. To this end, HEK293T cells were transfected to express DCC in the presence or absence of netrin-1, with or without DCC-5Fbn, and cell death was determined by Trypan blue exclusion assay (Figure 4a) or caspase assay (not shown). As shown in Figure 4a, although DCC failed to trigger cell death in the presence of netrin-1, the addition of DCC-5Fbn was sufficient to block the inhibitory activity of netrin-1, thus leading to DCC-induced cell death. A similar effect was observed with UNC5H2 when cell death was measured by TUNEL staining (Figure 4b). Thus, DCC-5Fbn interfered with netrin-1-mediated receptor multimerization, and triggered cell death.

DCC-5Fbn not only triggered apoptosis in HEK293T cells ectopically expressing DCC/UNC5H2, but also was active in a more pathophysiologically relevant setting: previously we reported that DCC-5Fbn not only induces apoptosis of endogenously netrin-1 expressing metastatic breast cancer lines and non-small-cell lung cancer cell lines or neuroblastoma cell lines *in vitro*, but also inhibits tumor growth and metastasis in different animal models.[23–25] Similarly, the colorectal cancer cell line, HCT116, expresses netrin-1 receptors and a high level of netrin-1 at the RNA level (Figure 5a), which is associated with the secretion of netrin-1 protein, as shown by netrin-1 immunohistochemistry performed on non-permeabilized cells (Figure 5b). When these HCT116 cells were treated with DCC-5Fbn, apoptotic cell death was induced, as measured by Trypan blue exclusion and caspase-3 activity assays (Figure 5c); furthermore, this death effect was specifically related to an inhibition of netrin-1 activity, as the addition of recombinant netrin-1 in excess blocked DCC-5Fbn-mediated killing. To provide further support for the *in vivo* efficacy of DCC-5Fbn to limit tumor progression,[23–25] HCT116 cells were grafted onto the chorioallantoic membrane (CAM) of 10-day-old chick embryos, a model that has been shown to recapitulate both tumor growth at a primary site—that is, within the CAM—as well as tumor invasion and dissemination at a secondary site—metastasis to the lung.[25] HCT116 cells grafted-embryos were treated on day 10 and day 13 with PBS or DCC-5Fbn, and 17-day-old chicks were analyzed for primary tumor size and metastases in the lung. Interestingly, although DCC-5Fbn failed to have any significant effect on primary tumor size (not shown), DCC-5Fbn dramatically reduced lung metastasis formation (Figure 5d).

Taken together, these results demonstrate that the multimerization of the dependence receptors DCC and UNC5H is a sufficient mechanism to block their proapoptotic activity. Interestingly, this inhibitory mechanism appears to mirror what is observed with death receptors. Indeed, it is known that TNFr or Fas requires trimerization to induce apoptosis.[33] This intrinsic difference may therefore suggest a therapeutic strategy that uses dependence receptors. Indeed, the search for therapeutic molecules in the past has mainly led to hits that act on the inhibition of cellular processes – for example, kinase inhibitors, IAP inhibitors – rather than activators. As a consequence, inhibition of netrin-1 receptors' multimerization by the use of recombinant DCC-5Fbn or by any compound screened to interfere with receptor multimerization appears to be a tempting strategy for the treatment of cancers, in which netrin-1 autocrine expression has been acquired.

Materials and Methods

Cell cultures, transfection procedures, reagents, and immunoblots. Transient transfections of human embryonic kidney 293T cells (HEK293T) were performed as previously described,[4] according to a modified calcium phosphate procedure or using Lipofectamine according to the manufacturer's instructions (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Immunoblots were performed as described previously[10] using anti-Myc (Sigma, St Louis, MO, USA, 1/1000), anti-FlagM2 (Sigma, Santa Clara, CA, USA, 1/10000), anti-HA (Sigma, 1/5000), anti-DCC Ab20 (Tebu, Santa Cruz, CA, USA; 1/1000). The artificial dimerizing agent AP20187 was from Ariad Pharmaceuticals, Cambridge, MA, USA. The DCC-EC was purchased from R&D system, Minneapolis, MN, USA. Netrin-1 (with a FlagM2 tag) was from Apotech, Epalinges Switzerland. For cell death analysis, caspase activity measurement and immunoprecipitation, AP20187 was used at a final concentration of 10 nM, netrin-1 was used at a final concentration of 300 ng/ml.

Site-directed mutagenesis and plasmid construction. pCMV and pGNET1 were described previously.[10] pK^k was described by Llambi *et al.*[34] DCC-HA was obtained by introducing an HA tag in the template pCMV-DCC (described by Mehlen *et al.*[10]) by QuikChange site-directed mutagenesis system (Stratagene, Santa Clara, CA, USA) using the following primers: DCC-HA F:

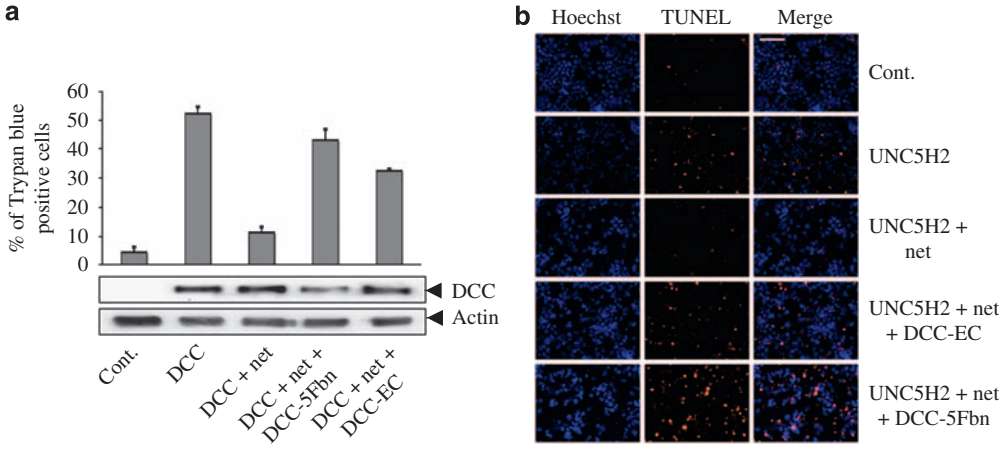


Figure 4 DCC-5Fbn triggers cell death by disruption of netrin-1-mediated inhibition of DCC/UNC5H2 proapoptotic activity. (**a**) HEK293T cells were transiently transfected with a mock (Cont.) or a full-length DCC construct (DCC) and incubated with or without netrin-1 (net) (150 ng/ml) and/or DCC-5Fbn (800 ng/ml) or the complete extracellular domain of DCC (DCC-EC) (200 ng/ml). Cell death was assessed by Trypan blue staining. Inset: DCC immunoblot showing DCC expression level in the different tested conditions. Actin loading control is also shown. (**b**) HEK293T cells were transiently transfected with a mock (Cont.) or a full-length UNC5H2 construct (UNC5H2) and incubated with or without netrin-1 (net) (500 ng/ml) and/or DCC-5Fbn (1000 ng/ml) or the complete extracellular domain of DCC (DCC-EC) (200 ng/ml). Cell death was measured by fluorescent TUNEL staining. Hoechst staining shows cell nuclei. For each condition, at least five randomly chosen fields were analyzed and photographed under epifluorescence microscopy. A representative field is presented from three independent experiments. Superimposed photographs (Merge) are shown. Scale bar represents 100 μM

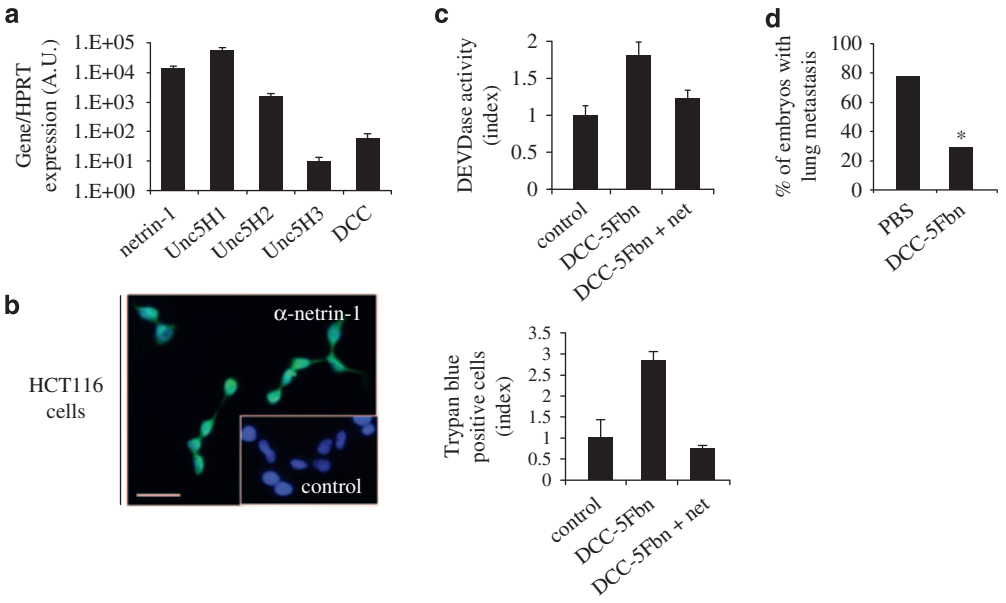


Figure 5 DCC-5Fbn triggers HCT116 cell death *in vitro* and inhibits HCT116 cell metastasis in a chicken model. (**a**) Quantification of netrin-1 and netrin-1 receptors. Ratio of netrin-1 and netrin-1 receptors expression to HPRT housekeeping gene is presented. (**b**) Representative netrin-1 immunohistochemistry on HCT116 tumor cell line. Inset: Control without primary antibody is presented. Scale bar represents 50 μM. (**c**) Quantitative analysis of cell death in HCT116 cell line treated with DCC-5Fbn, with or without addition of netrin-1 in excess to reverse the effect of DCC-5Fbn. Cell death was quantified by Trypan blue exclusion assay (below panel), while apoptosis was monitored by measuring relative DEVDase activity (upper panel). (**d**) HCT116 cells were grafted in chick chorioallantoic membrane at day 10 and DCC-5Fbn or PBS was injected on days 10 and 13. Tumors and lungs were harvested on day 17. Percentage of embryos with lungs invaded by human HCT116 cells after two injections (days 10 and 13) of either DCC-5Fbn or PBS is shown. *Indicates a $P<0.05$ calculated using a χ^2-test

5′-CACAGGCTCAGCCTTTTATCCATATGATGTACCGGATTATGCATAACATGTA TTTCTGAATG-3′, DCC-HA R: 5′-CATTCAGAAATACATGTTATGCATAATCCG GTACATCATATGGATAAAAGGCTGAGCCTGTG-3′. DCC-Myc was also obtained by introducing a Myc tag in the template pCMV-DCC by QuikChange using the following primers: DCC-Myc F: 5′-CACAGGCTCAGCCTTTGAGCAGAAGT TGATAAGTGAGGAAGATCTGTAACATGTATTTCTGAATG-3′. DCC-Myc R: 5′-C ATTCAGAAATACATGTTACAGATCTTCCTCACTTCTCAACTTCTGCTCAAAGGC TGAGCCTGTG-3′. Fv2e-HA encoding expression vector (in pC4M) from the Argent Regulated Homodimerization kit is from Ariad Pharmaceuticals. From this plasmid, the Fv2e-DCC^{IC}-HA plasmid was constructed. A PCR fragment of the intracellular domain of DCC (1122–1447) was obtained with the primers: F: 5′-TAT GTCGACCGACGCTCTTCAGCCCAGCAGAGA-3′ and R: 5′-TATGAATTCTTAG TCGAGTGCGTAGTCTGGTACGTCGTACGGATAAAAGGCTGAGCCTGTGATG GCATTAAG-3′. The reverse primer fused the HA tag to C-terminal end of DCC. The PCR fragment was subcloned in HA-Fv2e by *Sal*I and *Eco*RI restriction digestion. The Fv2e-DCC^{IC}-Myc was obtained using the QuikChange site-directed mutagenesis system (Stratagen) with pC4M-Fv2e-DCC^{IC}-HA as template and the following primers: primer F: 5′-CTTAATGCCATCACAGGCTCAGCCTTTGA

ACAGAAACTCATCTCTGAAGAGGATCTGTAAGAATTCATAAAGGGCAAT-3′ and primer R: 5′-ATTGCCCTTTATGAATTCTTACAGATCCTCTTCAGAGATGAGTTTC TGTTCAAAGGCTGAGCCTGTGATGGCATTAAG-3′. UNC5H2-HA (in pcDNA3.1) has already been described;[11] the constructs encoding UNC5H2-FlagM2 was generated by cloning in p3xFlag-CMV-7.1 (Sigma) the *Not*I–*Eco*RI PCR fragment derived from UNC5H2-HA as template and the following primers: primer F: 5′-GCGCGGCCGCAGGGCCCGGAGCGGG-3′ and primer R: 5′-CGGAA TTCTCAGCAATCGCCATCAGTGGTC-3′. Fv2e-UNC5H2^{IC}-HA and Fv2Ee-UNC5H2^{IC}-Myc in pC4M were generated by PCR amplification of the UNC5H2 intracellular domain using the following primers: UNC5H2-HA F: 5′-CGGTC GACGTGTACCGGAGAAACTGC-3′ and UNC5H2-HA R: 5′-GCGAATT CTCATGCATAATCCGGCACATCATACGGATAGCAATCGCCATCAGTGGTC-3′, and UNC5H2-Myc F: 5′-CGGTCGACGTGTACCGGAGAAACTGC-3′ and UNC5H2-Myc R: 5′-GCGAATTCTCACAGATCCTCTTCTGAGATGAGTTTTTG TTCGCAATCGCCATCAGTGGTC-3′, respectively. The PCR fragments were cloned in Fv2e-HA by *Sal*I and *Eco*RI restriction digestion. The cDNA encoding the Fv2e-UNC5H2^{IC}-HA and Fv2e-UNC5H2^{IC}-Myc fusion proteins were then subcloned in pcDNA3.1-TOPO by PCR using the following primers: Fv2e F: 5′-CCACCATGGGGAGTAGCA-3′ and UNC5H2-HA R: 5′-TCATGCAT AATCCGGCACATCATACGGATAGCAATCGCCATCAGTGGTC-3′, and Fv2e F 5′-CCACCATGGGGAGTAGCA-3′ and UNC5H2-Myc R: 5′-TCACAG ATCCTCTTCTGAGATGAGTTTTTGTTCGCAATCGCCATCAGTGGTC-3′, respectively and Fv2e-UNC5H2^{IC}-HA and Fv2e-UNC5H2^{IC}-Myc in pC4M as respective templates. pLIM01-DCC-5Fbn-His allowing bacterial expression of the fifth fibronectin type III domain of DCC was carried out by M Noirclerc-Savoye and B Gallet from the laboratory RoBioMol at the Institut de Biologie Structurale, Grenoble. This plasmid was created by using the Ligation Independent Cloning strategy (Novagen, San Diego, CA, USA). A PCR fragment of DCC-5Fbn was produced using plasmid pQE-Flag-DCC-5Fbn as template. The PCR product was inserted into pLIM01 by spontaneous hybridization. The pQE-Flag-DCC-5Fbn construct was carried out by Apotech by inserting human DCC-5Fbn fragment in *Pst*I and *Bam*HI sites in plasmid pQE-Flag.

DCC-5Fbn production. DCC-5Fbn production was performed using a standard procedure. Briefly, BL21 cells were forced to express DCC-5Fbn in response to IPTG and the BL21 lysate was subjected to affinity chromatography using His purification on Ni-NTA columns (Qiagen, Courtaboeuf, France) or Flag-agarose (Sigma) to respectively obtain His-tagged DCC-5Fbn or Flag-tagged DCC-5Fbn.

Immunoprecipitation. Co-immunoprecipitations were carried out on HEK293T cells transfected with various tagged constructs as described previously.[30] Briefly, HEK293T cells were lysed in 50 mM HEPES pH 7.6, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, and 0.1% NP-40 in the presence of protease inhibitor and sonicated 2 pulses of 5 s, and further incubated with anti-HA (Sigma), anti-Myc antibody (Sigma), anti-FlagM2 (Sigma) and protein-A Sepharose (Sigma). Washes were performed in 50 mM HEPES pH 7.6, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA.

Binding assay and ELISA competition assay. DCC-5Fbn (100 ng) or IL3-R (R&D systems, 600 ng) was coated on maxisorp plate (Nunc, Rochester, NY, USA) and increasing doses of netrin-1 (Apotech) were added (0–800 ng) for binding assay. DCC-EC (R&D systems, 150 ng) was coated on maxisorp plate for ELISA competition assay. Netrin-1 (Apotech, 50 ng) and competitor DCC-EC or DCC-5Fbn were then added simultaneously in increasing concentration. After washes, for both binding assay or ELISA competition assay, residual netrin-1 still fixed was revealed with an anti-netrin-1 antibody (R&D systems) and OPD revelation (Sigma).

Cell death analysis and caspase activity measurement. Cell death was analyzed 48 h after transfection using Trypan blue staining procedures as described previously.[10] To select transfected cells, cells were co-transfected with the surface marker pK^{k} and the plasmid encoding genes of interest. Transfected cells expressing the marker were magnetically labeled with MACSelect Microbeads and separated using a MACS Separator and Separation Columns (Miltenyi Biotec, Berglisch Gladbach, Germany). Trypan blue exclusion was assayed on these purified cells. Caspase-3 activity was measured by using the Caspase-3 assay from BioVision, Mountain View, CA, USA. Caspase activity is presented as the ratio between the caspase activity of the sample and that measured in HEK293T cells transfected with pCMV. For cell death analysis and caspase activity measurement, AP20187 or/and netrin-1 or/and DCC-5Fbn were added in cell culture medium 20 and 1 h before collecting cells. TUNEL staining was carried out as previously described[10,30] but with fluorescent staining using streptavidine-conjugated Cy3 antibody (Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK; 1/1000) and Hoechst (Sigma, 1/1000).

Immunohistochemistry. HEK293T were transfected with Myc-tagged netrin-1 for 48 h. Cells were treated 24 h before harvesting by DCC-5Fbn (1 μg/ml) and 1 h before with or without Heparinase III (Sigma, 2 μg/ml). Cells were fixed in PFA 4% (30 min), permeabilized by PBS Triton 0.2% (20 min) and incubated for saturation in PBS-BSA 2%-Normal donkey serum 2% (2 h). Primary antibodies were added overnight (Myc-rabbit Sigma, 1/400; FlagM2-mouse Sigma, 1/400) and secondary antibodies were added for 1 h(Cy5-Donkey anti-rabbit, Jackson ImmunoResearch, 1/450; Alexa 488-Donkey anti mouse, Jackson ImmunoResearch, 1/450, respectively). Immunohistochemistry on HCT116 cells was performed as for HEK293T cells with netrin-1 primary antibody (R&D System, 1/150) for 2 h and Alexa 488-Donkey anti-rat secondary antibody (Jackson ImmunoResearch, 1/450) for 1 h.

Metastasis quantification in chicken model. HCT116 colorectal tumoral cells (2×10^7) were seeded on 10-day-old (day 10) chick CAM. HCT116 cells were suspended in 100 μl of either DCC-5Fbn solution (0.05 μg/μl) or PBS. A second injection of DCC-5Fbn or PBS was performed on the tumor at day 13 (100 μl of DCC-5Fbn 0.05 μg/μl or 100 μl of PBS). To assess metastasis, the lungs were harvested from the tumour-bearing embryos and genomic DNA was extracted with the NucleoSpin Tissue kit (Macherey Nagel, Duren, Germany). Metastasis was quantified by PCR-based detection of the human Alu sequences using the primers 5′-ACG CCTGTAATCCCAGCACTT-3′ (sense) and 5′-TCGCCCAGGCTGGAGTGCA-3′ (antisense) and the chick glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-specific primers (sense, 5′-GAGGAAAGGTCGCCTGGTGGATCG-3′; antisense, 5′-GGTG AGGACAAGCAGTGAGGAACG-3′) as controls. For both couples of primers, metastasis was assessed by polymerase activation at 95°C for 2 min followed by 30 cycles at 95 °C for 30 s, 63 °C for 30 s, and 72 °C for 30 s. Genomic DNA extracted from the lungs of healthy chick embryos were used to determine the threshold between HCT116 cells invaded and non-invaded lungs.

Acknowledgements. We thank C Forcet, C Bonod-Bidaud, C Maisse, and A Paradisi for preliminary works and Jonathan Blachier for excellent technical help. We also thank M Noirclerc-Savoye and B Gallet (RoBioMol at the Institut de Biologie Structurale, Grenoble) for materials. This study was supported by the Ligue Contre le Cancer, the Agence Nationale de la Recherche (PM), the Institut National du Cancer (PM), the Rhône-Alpes Region (PM), the Centre National de la Recherche Scientifique (PM), and the NIH (PM and DEB). FM was supported by a Rhône-Alpes Region fellowship.

1. Mehlen P, Bredesen DE. The dependence receptor hypothesis. *Apoptosis* 2004; **9**: 37–49.
2. Rabizadeh S, Oh J, Zhong LT, Yang J, Bitler CM, Butcher LL *et al*. Induction of apoptosis by the low-affinity NGF receptor. *Science* 1993; **261**: 345–348.
3. Bordeaux MC, Forcet C, Granger L, Corset V, Bidaud C, Billaud M *et al*. The RET proto-oncogene induces apoptosis: a novel mechanism for Hirschsprung disease. *EMBO J* 2000; **19**: 4056–4063.
4. Thibert C, Teillet MA, Lapointe F, Mazelin L, Le Douarin NM, Mehlen P. Inhibition of neuroepithelial patched-induced apoptosis by sonic hedgehog. *Science* 2003; **301**: 843–846.
5. Stupack DG, Puente XS, Boutsaboualoy S, Storgard CM, Cheresh DA. Apoptosis of adherent cells by recruitment of caspase-8 to unligated integrins. *J Cell Biol* 2001; **155**: 459–470.
6. Matsunaga E, Tauszig-Delamasure S, Monnier PP, Mueller BK, Strittmatter SM, Mehlen P *et al*. RGM and its receptor neogenin regulate neuronal survival. *Nat Cell Biol* 2004; **6**: 749–755.
7. Mourali J, Benard A, Lourenco FC, Monnet C, Greenland C, Moog-Lutz C *et al*. Anaplastic lymphoma kinase is a dependence receptor whose proapoptotic functions are activated by caspase cleavage. *Mol Cell Biol* 2006; **26**: 6209–6222.
8. Tauszig-Delamasure S, Yu LY, Cabrera JR, Bouzas-Rodriguez J, Mermet-Bouvier C, Guix C *et al*. The TrkC receptor induces apoptosis when the dependence receptor notion meets the neurotrophin paradigm. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; **104**: 13361–13366.
9. Furne C, Ricard J, Cabrera JR, Pays L, Bethea JR, Mehlen P *et al*. EphrinB3 is an anti-apoptotic ligand that inhibits the dependence receptor functions of EphA4 receptors during adult neurogenesis. *BBA Biol Mol Cell* 2009; **1793**: 231–238.
10. Mehlen P, Rabizadeh S, Snipas SJ, Assa-Munt N, Salvesen GS, Bredesen DE. The DCC gene product induces apoptosis by a mechanism requiring receptor proteolysis. *Nature* 1998; **395**: 801–804.

11. Llambi F, Causeret F, Bloch-Gallego E, Mehlen P. Netrin-1 acts as a survival factor via its receptors UNC5H and DCC. *EMBO J* 2001; **20**: 2715–2722.
12. Serafini T, Kennedy TE, Galko MJ, Mirzayan C, Jessell TM, Tessier-Lavigne M. The netrins define a family of axon outgrowth-promoting proteins homologous to *C. elegans* UNC-6. *Cell* 1994; **78**: 409–424.
13. Serafini T, Colamarino SA, Leonardo ED, Wang H, Beddington R, Skarnes WC *et al.* Netrin-1 is required for commissural axon guidance in the developing vertebrate nervous system. *Cell* 1996; **87**: 1001–1014.
14. Hedgecock EM, Culotti JG, Hall DH. The unc-5, unc-6, and unc-40 genes guide circumferential migrations of pioneer axons and mesodermal cells on the epidermis in *C. elegans*. *Neuron* 1990; **4**: 61–85.
15. Chan SS, Zheng H, Su MW, Wilk R, Killeen MT, Hedgecock EM *et al.* UNC-40, a *C. elegans* homolog of DCC (Deleted in Colorectal Cancer), is required in motile cells responding to UNC-6 netrin cues. *Cell* 1996; **87**: 187–195.
16. Fearon ER, Cho KR, Nigro JM, Kern SE, Simons JW, Ruppert JM *et al.* Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers. *Science* 1990; **247**: 49–56.
17. Mehlen P, Fearon ER. Role of the dependence receptor DCC in colorectal cancer pathogenesis. *J Clin Oncol* 2004; **22**: 3420–3428.
18. Fazeli A, Dickinson SL, Hermiston ML, Tighe RV, Steen RG, Small CG *et al.* Phenotype of mice lacking functional deleted in colorectal cancer (Dcc) gene. *Nature* 1997; **386**: 796–804.
19. Grady WM. Making the case for DCC and UNC5C as tumor-suppressor genes in the colon. *Gastroenterology* 2007; **133**: 2045–2049.
20. Thiebault K, Mazelin L, Pays L, Llambi F, Joly MO, Saurin JC *et al.* The netrin-1 receptors UNC5H are putative tumor suppressors controlling cell death commitment. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; **100**: 4173–4178.
21. Bernet A, Mazelin L, Coissieux MM, Gadot N, Ackerman SL, Scoazec JY *et al.* Inactivation of the UNC5C Netrin-1 receptor is associated with tumor progression in colorectal malignancies. *Gastroenterology* 2007; **133**: 1840–1848.
22. Mazelin L, Bernet A, Bonod-Bidaud C, Pays L, Arnaud S, Gespach C *et al.* Netrin-1 controls colorectal tumorigenesis by regulating apoptosis. *Nature* 2004; **431**: 80–84.
23. Fitamant J, Guenebeaud C, Coissieux MM, Guix C, Treilleux I, Scoazec JY *et al.* Netrin-1 expression confers a selective advantage for tumor cell survival in metastatic breast cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; **105**: 4850–4855.
24. Delloye-Bourgeois C, Brambilla E, Coissieux MM, Guenebeaud C, Pedeux R, Firlej V *et al.* Interference with netrin-1 and tumor cell death in non-small cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 2009; **101**: 237–247.
25. Delloye-Bourgeois C, Fitamant J, Douc-Rasy S, Cappellen D, Racquin MA, Stupack D *et al.* Netrin-1 acts as a survival factor for aggressive neuroblatoma. *J Exp Med* 2009; **206**: 833–847.
26. Link BC, Reichelt U, Schreiber M, Kaifi JT, Wachowiak R, Bogoevski D *et al.* Prognostic implications of netrin-1 expression and its receptors in patients with adenocarcinoma of the pancreas. *Ann Surg Oncol* 2007; **14**: 2591–2599.
27. Stein E, Zou Y, Poo M, Tessier-Lavigne M. Binding of DCC by netrin-1 to mediate axon guidance independent of adenosine A2B receptor activation. *Science* 2001; **291**: 1976–1982.
28. Wang JJ, Rabizadeh S, Tasinato A, Sperandio S, Ye X, Green M *et al.* Dimerization-dependent block of the proapoptotic effect of p75(NTR). *J Neurosci Res* 2000; **60**: 587–593.
29. Yang X, Chang HY, Baltimore D. Autoproteolytic activation of pro-caspases by oligomerization. *Mol Cell* 1998; **1**: 319–325.
30. Forcet C, Ye X, Granger L, Corset V, Shin H, Bredesen DE *et al.* The dependence receptor DCC (deleted in colorectal cancer) defines an alternative mechanism for caspase activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; **98**: 3416–3421.
31. Geisbrecht BV, Dowd KA, Barfield RW, Longo PA, Leahy DJ. Netrin binds discrete subdomains of DCC and UNC5 and mediates interactions between DCC and heparin. *J Biol Chem* 2003; **278**: 32561–32568.
32. Kruger RP, Lee J, Li W, Guan KL. Mapping netrin receptor binding reveals domains of Unc5 regulating its tyrosine phosphorylation. *J Neurosci* 2004; **24**: 10826–10834.
33. Muppidi JR, Tschopp J, Siegel RM. Life and death decisions: secondary complexes and lipid rafts in TNF receptor family signal transduction. *Immunity* 2004; **21**: 461–465.
34. Llambi F, Lourenco FC, Gozuacik D, Guix C, Pays L, Del Rio G *et al.* The dependence receptor UNC5H2 mediates apoptosis through DAP-kinase. *EMBO J* 2005; **24**: 1192–1201.

Au cours de ma thèse, je me suis également intéressée à la signalisation pro-apoptotique des récepteurs UNC5H. Mon objectif était de découvrir de nouveaux acteurs de ces voies en utilisant une approche fonctionnelle d'ARN interférence. Ce travail a permis la réalisation d'un article dans lequel je suis premier auteur, actuellement soumis à *Molecular Cell* et présenté ici sous forme de résumé avec l'article joint.

Article 5 : La déphosphorylation de la DAP Kinase nécessaire à l'induction de l'apoptose par le récepteur UNC5H2 est médiée par la protéine phosphatase PP2A

The dependence receptor UNC5H2 triggers apoptosis via PP2A-mediated dephosphorylation of DAP kinase

Guenebeaud C., Castets M., Guix C., Delloye-Bourgeois C., Eisenberg-Lerner A., Shohat G., Zhang M. , Kimchi A., Bernet A., Mehlen P. 2010 (soumis)

Dans l'objectif d'identifier de nouveaux partenaires apoptotiques de la voie UNC5H, j'ai tout d'abord cherché un système inductible pour les voies de signalisation pro-apoptotique UNC5H. J'ai ainsi identifié la lignée tumorale mammaire humaine Cal51 comme une lignée exprimant la Nétrine-1 et les récepteurs UNC5H1-3 (l'expression du récepteur DCC étant perdue dans cette lignée) et dont la mort pouvait être induite par un traitement avec le peptide DCC-5Fbn *in vitro*.

Après avoir infecté cette lignée avec une banque de lentivirus capable de cibler 8500 gènes humains par shRNA, j'ai sélectionné les cellules où un effecteur essentiel des voies pro-apoptotiques UNC5H était inhibé par ARN interférence, par traitement avec le peptide DCC-5Fbn. Actuellement, les shRNA exprimés par 47 des clones résistants obtenus ont été analysés par RT-PCR et séquençage afin d'identifier les acteurs potentiellement impliqués dans les voies de signalisation apoptotiques médiées par les récepteurs UNC5H.

Parmi ces candidats, je me suis concentrée sur un effecteur retrouvé deux fois (grâce à deux séquences shRNA différentes présentes dans la banque lentivirale) : PR65ß, sous-unité de la protéine phosphatase PP2A (*Protein Phosphatase 2A*) décrite pour être potentiellement impliquée dans la déphosphorylation nécessaire à l'activation de la DAPk effecteur connu de la voie de signalisation apoptotique du récepteur UNC5H2 (Llambi et al., 2005). En effet, le groupe d'Adi Kimchi avait récemment montré que la déphosphorylation de la DAPk pouvait être inhibée *in vitro* par un inhibiteur des phosphatases (l'acide okadaïque) (Gozuacik et al., 2008).

Nous avons donc cherché à vérifier que le complexe PP2A/PR65β était impliqué dans l'apoptose induite par le récepteur UNC5H2 en stimulant la déphosphorylation de la DAPk. Tout d'abord, nous avons montré que l'inhibition de PR65β était suffisante pour inhiber l'apoptose induite par les récepteurs UNC5H1 et UNC5H2 mais que cette inhibition n'avait aucune influence sur la mort induite par le récepteur Patched (un autre récepteur à dépendance n'ayant pas de lien connu avec PP2A ou la DAPk) dans des cellules HEK293T. Nous avons également montré que l'inhibition de PR65β (par siRNA) ou de PP2A (acide okadaïque) était suffisante pour bloquer la déphosphorylation de la DAPk observée au cours de l'apoptose médiée par le récepteur UNC5H2 et décrite précédemment au laboratoire comme essentielle d'une part à l'activation de la DAPk et d'autre part à l'induction de l'apoptose par le récepteur UNC5H2 (Llambi et al., 2005).

Dans un deuxième temps, nous avons cherché à savoir si la DAPk, UNC5H2 et PR65β étaient capables de former un complexe en condition apoptotique c'est-à-dire en absence de Nétrine-1. Un premier argument est que la DAPk et PR65β colocalisent dans les rafts. Par ailleurs, au laboratoire, il avait été montré que la DAPk et UNC5H2 interagissaient constitutivement (c'est-à-dire en absence ou en présence de Nétrine-1) (Llambi et al., 2005). Par des expériences de gel filtration sur des lysats de cellules HEK293T transfectées avec UNC5H2 et la DAPk, nous avons montré que PR65β est spécifiquement recruté par ce complexe en absence de Nétrine-1. De plus, nous nous sommes demandés si la conformation du domaine intracellulaire du récepteur UNC5H2 était impliquée dans ce recrutement. En effet, il a été récemment montré par l'équipe Zhang que le domaine intracellulaire du récepteur UNC5H2 est capable d'adopter (i) une conformation anti-apoptotique où la formation d'un supramodule masque le domaine de mort (domaine principalement impliqué dans la fonction apoptotique du récepteur UNC5H2), phénomène qui serait à l'origine d'une inhibition du recrutement des effecteurs pro-apoptotiques d'UNC5H2. Le domaine intracellulaire serait aussi capable d'adopter en absence de Nétrine-1 (ii) une conformation pro-apoptotique dépourvue de ce supramodule, exposant ainsi le domaine de mort et permettant l'induction de l'apoptose en permettant le recrutement de partenaires pro-apoptotiques. L'équipe de Zhang a généré des mutants d'UNC5H2 mimant ces deux conformations : le mutant pro-apoptotique UNC5H2-V619Q et le mutant non-apoptotique UNC5H2-K932E (Wang et al., 2009a). Les gels filtrations utilisants ces mutants ont montré que PR65β était spécifiquement recruté dans un complexe contenant le mutant conformationnel pro-apoptotique confirmant l'hypothèse selon laquelle la modification

conformationnelle du domaine intracellulaire du récepteur UNC5H2 est bien à l'origine de la modulation du recrutement des partenaires pro-apoptotiques.

Par ailleurs, nous avons montré que PR65β était capable d'interagir avec le récepteur UNC5H2 dans des cellules HEK293T transfectées mais aussi *in vivo* dans le cerveau de souris OF1.

D'autre part, nous nous sommes demandés si la protéine CIP2A (*Cancerous inhibiteur of PP2A*), identifiée récemment comme un inhibiteur de PP2A interagissant avec la sous-unité PR65 et capable de bloquer la déphosphorylation de la protéine c-Myc normalement médiée par PP2A était capable de moduler la déphosphorylation de la DAPk (Junttila et al., 2007b; Junttila and Westermarck, 2008; Khanna et al., 2009).

Nous avons montré dans des cellules HEK293T que CIP2A est capable d'interagir spécifiquement avec le récepteur UNC5H2 en présence de Nétrine-1 mais est également capable d'inhiber la mort induite par ce récepteur. En effet, la surexpression de CIP2A est suffisante à inhiber l'apoptose induite par UNC5H2. A l'inverse, nous avons montré que l'inhibition de CIP2A par siRNA potentialise l'apoptose induite par UNC5H2, phénomène directement lié à une déphosphorylation accrue de la DAPk. Ces éléments semblent donc indiquer que la déphosphorylation de la DAPk au cours de l'apoptose induite par UNC5H2 est modulée par le recrutement de PP2A selon un mécanisme dépendant de la conformation du domaine intracellulaire du récepteur UNC5H2 et d'autre part par l'effet inhibiteur de CIP2A en présence de Nétrine-1 sur la déphosphorylation de la DAPk.

Dans un troisième temps, nous avons voulu vérifier le rôle de PR65ß/PP2A dans la signalisation pro-apoptotique du récepteur UNC5H2 *in vivo*. Récemment, il a été montré que la Nétrine-1 était un facteur pro-angiogénique et que son effet était médié par le récepteur UNC5H2 (Castets et al., 2009). Chez des embryons zebrafishs *fli :egfp* (exprimant la GFP dans l'ensemble de leurs cellules vasculaires), l'injection d'un morpholino inhibiteur de la Nétrine-1a endogène induit des défauts de formation des vaisseaux intersegmentaires. Ce phénotype étant réversé par l'injection d'un morpholino PR65ß. Ceci suggère que PP2A/PR65ß serait impliqué dans la régulation de la survie des cellules endothéliales via la voie de signalisation médiée par le complexe UNC5H2/PR65ß/DAPk *in vivo*.

En conclusion, nous avons identifié de nouveaux effecteurs potentiels des voies de signalisation apoptotiques médiées par les récepteurs UNC5H et nous avons mis en évidence PR65β comme un partenaire essentiel de l'apoptose induite par le récepteur UNC5H2 *in vitro* et *in vivo*. Nous avons montré que PR65β était spécifiquement recruté par le complexe

UNC5H2/DAPk en absence de Nétrine-1 et que ce recrutement était dépendant de la conformation du récepteur UNC5H2. Nous avons également montré que PP2A/PR65β était responsable de la déphosphorylation de la DAPk en absence de Nétrine-1 et nous avons proposé un double mécanisme pour expliquer que malgré une interaction constitutive d'UNC5H2 et de la DAPk, la DAPk n'est déphosphorylée et activée qu'en absence de Nétrine-1. En effet, nos résultats montrent d'une part que le recrutement du complexe PP2A/PR65β est dépendant de la conformation du domaine intracellulaire du récepteur UNC5H2 et d'autre part que l'association de CIP2A avec le récepteur UNC5H2 en présence de Nétrine-1 est à l'origine d'une inhibition de la désphosphorylation de la DAPk par PP2A.

The dependence receptor UNC5H2 triggers apoptosis via PP2A-mediated dephosphorylation of DAP kinase

Céline Guenebeaud[1], Marie Castets[1], Catherine Guix[1], Céline Delloye-Bourgeois[1], Avital Eisenberg-Lerner[2], Galit Shohat[2], Mingjie Zhang[3], Adi Kimchi[2#], Agnès Bernet[1#] and Patrick Mehlen[1§]

[1]Apoptosis, Cancer and Development Laboratory- Equipe labellisée 'La Ligue', CNRS UMR5238, Université de Lyon, Centre Léon Bérard, 69008 Lyon. [2]Department of Molecular Genetics. Weizmann Institute of Science, Rehovot 76100, Israel. [3]Department of Biochemistry, Molecular Neuroscience Center, Hong Kong University of Science and Technology, Hong Kong.

§Corresponding author: P. Mehlen; FAX (33) 4 78 78 28 87; e-mail: mehlen@lyon.fnclcc.fr

#have contributed equally to this work.

Summary

The UNC5H dependence receptors have been shown to promote apoptosis in absence of their ligand netrin-1. This activity appears to be crucial for neuronal fate during nervous system development, for the regulation of developmental angiogenesis or for the limitation of cancer progression. It has been recently shown that UNC5H2 triggers cell death through the recruitment and activation of the serine-threonine protein kinase DAPk. This activation occurs via the loss of autophosphorylation of DAPk. While performing a siRNA screen to identify genes implicated in UNC5H-induced apoptosis, we identified that the structural subunit PR65β (PPP2R1B) of the holoenzyme protein phophatase 2A (PP2A) as a key regulator of UNC5H2 pro-apoptotic activity. Our data show that UNC5H2 recruits PR65β to form a protein complex that includes DAPk. PR65β/PP2A activity is required for UNC5H2-induced apoptosis and for DAPk activation since it triggers the dephosphorylation of DAPk. Moreover, we show that netrin-1 binding to UNC5H2 prevents this pro-apoptotic effect through recruitment to UNC5H2 of the PP2A inhibitor CIP2A. Thus, we propose that in the absence of netrin-1, UNC5H2 recruitment of PP2A allows the activation of DAPk via a PP2A-mediated dephosphorylation. We also propose that PP2A activity, via its ability to transduce UNC5H2 pro-apoptotic signal, is important for angiogenesis regulation.

Introduction

The Death-Associated-Protein-kinase (DAPk) (Deiss et al., 1995) (Feinstein et al., 1995) is a crucial intracellular protein that mediates cell death induction through a wide spectrum of apoptotic and non apoptotic signals via its serine threonine kinase activity (Deiss et al., 1995) (Cohen et al., 1999; Eisenberg-Lerner and Kimchi, 2007; Gozuacik et al., 2008). As such DAPk is implicated in the suppression of early stages of oncogenesis (Raveh and Kimchi, 2001) and displays anti-metastatic activity (Inbal et al., 1997). DAPk is thus very often silenced mainly by promoter methylation in a wide spectrum of human cancers (Gozuacik and Kimchi, 2006; Kawaguchi et al., 2004). However, while DAPk is a key player in cell death regulation, very few interacting proteins which function as direct activators of its catalytic activity are known. The later comprises the calmodulin (CaM) protein which binds to DAPk's CaM regulatory region and is triggered by a calcium spike (Cohen et al., 1997), ERK kinase which binds to the death domain of DAPk and activates its catalytic activity through a positive phosphorylation (Chen et al., 2005) and more recently the binding of the dependence receptor UNC5H2 via its death domain (Llambi et al., 2005).

Such dependence receptors share the property to induce in the absence of ligand, an active process of apoptotic cell death, a process blocked by ligand presence. These dependence receptors include $p75^{ntr}$, Patched (Ptc), Neogenin or the RET, TrkC, EPHA4 and Alk tyrosine kinase receptors and the netrin-1 receptors DCC (Deleted in Colorectal Cancer) and UNC5H -i.e., UNC5H1, UNC5H2, UNC5H3, UNC5H4-

(Bordeaux et al., 2000; Furne et al., 2009; Mehlen et al., 1998; Mehlen and Thibert, 2004; Mourali et al., 2006).

The DCC and UNC5H receptors are the prototype dependence receptors. They share the same ligand, netrin-1, which is a diffusible laminin-related protein. Netrin-1 has been shown to play a major role in the control of neuronal navigation during the development of the nervous system, by interacting with DCC (Deleted in Colorectal Cancer) (Forcet et al., 2002; Keino-Masu et al., 1996; Serafini et al., 1996) and UNC5H (Ackerman et al., 1997; Hong et al., 1999). Recently, netrin-1 has also been shown to contribute to the patterning of developing non-neuronal epithelial tissues such as mammary gland, pancreas and lung by regulating diverse processes and notably cell adhesion, motility, proliferation, and differentiation (for reviews (Cirulli and Yebra, 2007; Mehlen and Furne, 2005)). However, netrin-1 has also emerged as a cell survival cue. Indeed, netrin-1 appears to promote cell survival by inhibiting the pro-apoptotic activity of its receptors DCC and UNC5H (Llambi et al., 2001; Mehlen et al., 1998; Tanikawa et al., 2003) (Tang et al., 2008; Wang et al., 2008).

The pro-apoptotic activity of these unbound netrin-1 receptors has been shown to act as a mechanism for eliminating tumor cells that would develop in settings of netrin-1 unavailability –i.e. when tumor cells proliferate in an environment with limited netrin-1 availability or migrate toward tissues devoid of ligand during the metastatic process (Bernet et al., 2007; Delloye-Bourgeois et al., 2009a; Fitamant et al., 2008; Mazelin et al., 2004). However, DCC and UNC5H pro-apoptotic function is not limited to cancer regulation but is also implicated during development. The pro-apoptotic activity of netrin-1 dependence receptors is believed to be important for adequate neuronal

migration/localization during the development of the nervous system (Furne et al., 2008; Mehlen and Bredesen, 2004; Tang et al., 2008) but also for regulating developmental angiogenesis (Castets et al., 2009). In particular it has been shown that netrin-1 acts as a survival cue for endothelial cells by preventing apoptosis mediated by UNC5H2. More specifically, netrin-1 inactivation in zebrafish is associated with vessel defects that can be rescued by inhibiting apoptosis, using chemical reagents or via simultaneous inactivation of UNC5H2 (Castets et al., 2009). Interestingly, inactivation of DAPk also corrects the defects observed in netrin-1 knock-down zebrafish embryos, thus demonstrating the biological relevance of the UNC5H2-DAPk pathway during developmental angiogenesis (Castets et al., 2009).

The understanding of the mechanisms allowing UNC5H2 to mediate apoptosis through DAPk is then of crucial importance, since it is likely involved in several developmental and pathological processes. UNC5H2 was shown to recruit DAPk via their respective death domains and to activate this kinase by inhibiting its autophosphorylation. Indeed, DAPk displays an inhibitory autophosphorylation on serine 308 within the CaM regulatory region, previously shown by mutational analysis to mask its catalytic domain (Shohat et al., 2001). However the mechanism of dephosphorylation of serine 308 by UNC5H2 was unknown. Here we show that UNC5H2 interacts with the structural subunit PR65β (PPP2R1B) of the holoenzyme protein phosphatase PP2A.

PP2A is a ubiquitously expressed serine/threonine phosphatase that accounts for over 90% of phosphatase activity in eukaryotic cells. Yet, PP2A is not a single entity but rather a large collection of oligomeric enzymes that contain a common catalytic subunit (PP2AC). The catalytic subunit interacts with the PR65 scaffold protein and to a wide

family of regulatory β subunits (Janssens and Goris, 2001). Two alternative genes PR65α and PR65β encode two flavors of the PR65 scaffold protein. While most PP2A holoenzymes contain the PR65α isoform, PR65β appears to have a central regulatory role in cancer as it is decreased or mutated in a large fraction of human cancers and has been recently causally linked to cancer development (Eichhorn et al., 2008). Along this line PP2A inactivation in cancer also occurs frequently through up-regulation of CIP2A, a PR65 interactor and PP2A inhibitor (Junttila et al., 2007). We show here that UNC5H2, DAPk, PR65β and CIP2A form a protein complex and we present evidence to support the view that the recruitment of PP2A to UNC5H2 via the PR65β allows the activation of DAPk via its loss of phosphorylation.

Results

PR65β is required for UNC5H2-induced apoptosis.

In an attempt to understand the mechanisms allowing UNC5H receptors to trigger apoptosis, a siRNA screen was performed. We took advantage of the fact that a large fraction of tumors and cancer cell lines have acquired an autocrine production of netrin-1 to inhibit UNC5H-induced apoptosis (Fitamant et al., 2008) (Delloye-Bourgeois et al., 2009a) (Delloye-Bourgeois et al., 2009b). A treatment with a decoy protein, DCC-5Fbn, which interferes with netrin-1, was shown to trigger apoptosis of different netrin-1 expressing cancer cell lines, by restoring UNC5H-induced cell death (Fig.1A and (Delloye-Bourgeois et al., 2009a; Delloye-Bourgeois et al., 2009b; Fitamant et al., 2008)). The DCC-5Fbn sensitive Cal51 breast cancer cells (Cal51 express netrin-1 and UNC5H1, UNC5H2, UNC5H3 but not DCC, data not shown) were then infected with a 25500 shRNA encoded (and GFP encoded) lentivirus library and further treated with DCC-5Fbn (Fig.1B). Surviving cells correspond to those which have escaped UNC5H-induced cell death and were further individually grown. Corresponding inserted shRNAs were sequenced from 47 GFP positive-DCC-5FBn resistant clones (Fig.1B, see one example in Fig.1C). Supplementary Table 1 provides a list of genes putatively targeted by the shRNAs expressed in DCC-5Fbn-resistant clones. PR65β, the scaffold protein for PP2A was further studied because UNC5H2-induced apoptosis is known to be dependent on the loss of DAPk auto- inhibitory phosphorylation (Llambi et al., 2005).

We first assessed whether the siRNA encoded by the shRNA sequenced in the DCC-5Fbn-resistant clone was efficient in inhibiting PR65β expression and UNC5H-dependent apoptosis. Cal51 cells were then transfected with a netrin-1 siRNA, alone or in combination with the PR65β siRNA. As shown in Fig.1D, both siRNAs were effective in inhibiting respectively netrin-1 and PR65β. Cell death was then analysed via a TUNEL assay. While netrin-1 siRNA is associated with increased cell death, the co-transfection with PR65β fully inhibits this effect (Fig.1E). A similar experiment was performed on another tumor cell line showing an autocrine production of netrin-1. H358 lung cancer cells are dependent on their autocrine secretion of netrin-1 for survival and it was shown that in these cells, netrin-1 inhibition triggers UNC5H1 and UNC5H2-induced apoptosis (Delloye-Bourgeois et al., 2009a; Delloye-Bourgeois et al., 2009b). Similarly to Cal51 cells, while netrin-1 silencing in H358 cells is associated with caspase-3 activation, netrin-1 siRNA failed to trigger apoptosis of H358 cells when PR65β siRNA is co-transfected (Supplementary Fig.1). Along the same line, addition of 5nM of okadaic acid, a PP2A inhibitor, prevents apoptosis triggered by netrin-1 siRNA in both H358 or Cal51 cells (Supplementary Fig.1 and not shown). Thus, PR65β and PP2A activity appear to be required for netrin-1 withdrawal associated-UNC5H-dependent apoptosis.

To further define the nature of the implication of PR65β/PP2A in UNC5H-induced apoptosis, we took advantage of the HEK293T experimental cell system in which it was shown that UNC5H2 transfection triggers apoptosis (Llambi et al., 2001; Llambi et al., 2005; Tanikawa et al., 2003; Wang et al., 2009) and in which the role of DAPk in

UNC5H2-induced cell death was reported (Llambi et al., 2005). As shown in Fig.2A, PR65β siRNA transfection in HEK293T cells significantly reduces PR65β mRNA level. This decrease in mRNA is associated with a decrease at the protein level measured by immunoblot (Fig.2B) or by immunostaining (Suppl. Fig.2A). Of note PR65 exists under two isoforms PR65α and PR65β and the antibody used here and throughout the study detect both two isoforms –i.e., we failed to obtain one antibody specifically detecting the β isoform while it exists antibodies against the α isoform (see Fig.3A)-. However, the PR65β siRNA picked thanks to the shRNA screen is specific for PR65β as transfection with this siRNA has no effect on PR65α mRNA and protein level (Fig.2AB and Suppl. Fig.2A). PR65β siRNA transfection is moreover associated with a significant decrease in PP2A phosphatase activity (Suppl. Fig.2B).

We next confirm the implication of PR65β in cell death induced by UNC5H in HEK293T cells. Forced expression of UNC5H2 triggers HEK293T cells apoptosis as determined by TUNEL staining (Fig.2C) or by caspase-3 activity (Fig.2D), and is associated with increases PP2A phosphatase activity (Fig.2E). Down-regulation of PR65β by siRNA is sufficient to inhibit UNC5H2-mediated cell death (Fig.2CD). Similar data were obtained with UNC5H1 (Fig.2C and data not shown) and with another PR65β siRNA (Supp. Fig2C). As a negative control, apoptosis induced by forced expression of Patched (Ptc), another dependence receptor (Mille et al., 2009b; Thibert et al., 2003), is not significantly inhibited by down-regulation of the PR65β subunit (Fig.2C). Thus, PR65β and PP2A activity are required for UNC5H1/2-mediated apoptosis.

UNC5H2, PR65β and DAPk form a protein complex upon netrin-1 absence.

We next investigated whether PR65β interacts with UNC5H2. As shown in Fig.3A, in HEK293T cells, transfected UNC5H2 efficiently immunoprecipitates endogenous PR65β. Even though PR65α appears as the more abundant isoforms reported in most cell lines, we failed to detect UNC5H2/PR65α interaction, supporting the view that UNC5H2 specifically interacts with PR65β. The interaction was not only monitored by immunoprecipitation, but co-localization of UNC5H2 with PR65β was also detected by confocal analysis (Fig.3B). Interestingly addition of netrin-1 disrupts the UNC5H2/PR65β co-localization, hence supporting the view that netrin-1 prevents the adequate interaction between UNC5H2 and PR65β. The interaction between UNC5H2 and PR65β is not only detected in cell culture but occurs also *in vivo*. Indeed, in adult mice brain extract, pull-down of UNC5H2 allows the immunodetection of PR65β while immunoprecipitation of PR65β pulls down UNC5H2 (Fig.3C).

Because UNC5H2 was shown to interact with and activate DAPk, we then monitored whether UNC5H2, PR65β and DAPk could form a ternary complex acting on DAPk activation. As a first approach, we analyzed whether DAPk and PR65β colocalize in settings of absence of netrin-1. As shown in Fig.4A, in HEK293T cells, while in the absence of netrin-1 treatment, DAPk nicely co-localizes with PR65β, addition of netrin-1 disrupts the DAPk/PR65β co-localization. We have previously shown that UNC5H receptors are localized to lipid rafts and that the interaction between UNC5H2 and DAPk is dependent on lipid raft integrity (Maisse et al., 2008). Here, we find that DAPk, PR65β and the catalytic subunit of PP2A (PP2A-C) are both partially localized to detergent

resistant membranes that contain lipid rafts and are enriched in the lipid raft marker caveolin-1 (Fig 4B). When lipid rafts were disrupted by incubating the cells with methyl-β-cyclodextrin (MβCD) which extracts cholesterol from the plasma membrane, the presence of DAPk, PR65β and PP2A-C in the lipid raft fractions was abolished (Fig.4B).

We then performed size exclusion assay to detect DAPk/UNC5H2/PR65β complex in UNC5H2/DAPk transfected HEK293T cells. In the presence of netrin-1, both UNC5H2 and DAPk are eluted in large size complexes (400-2.000kDa) while PR65β is mainly detected upon small size (<400kDa) (Fig.4C). Remarkably, in the absence of netrin-1, while UNC5H2 and DAPk are still detected in similar high molecular fractions, PR65β is now detected into two picks of exclusion size: one with small complexes (<400kDa) and one corresponding to the UNC5H2/DAPk fractions (400-1000kDa). Moreover, in the absence of netrin-1, when a PR65β immunoprecipitation was performed on these large size fractions, we were able to detect both DAPk and UNC5H2 in the pull-down (Fig.4D). Thus, in the absence of netrin-1, UNC5H2, PR65β and DAPk are included in a large size protein complex.

It was recently shown that UNC5H2 intracellular domain can be folded in a closed conformation that prevents apoptosis by the masking of the pro-apoptotic death domain by the ZU5 domain (Wang et al., 2009). The overall view is thus that in the absence of netrin-1, the UNC5H2 adopts an open conformation allowing apoptosis induction. We thus took advantage of a mutant of UNC5H2 that is forced in an open conformation (UNC5H2 V619Q) (Wang et al., 2009). Similar size exclusion assays to detect DAPk/UNC5H2/PR65β complex where performed using this UNC5H2 mutant

instead of UNC5H2 wild-type. Of interest, while in the absence of netrin-1, in HEK293T cells transfected with UNC5H2 V619Q, PR65β is detected into the two picks of exclusion size (<400kDa and the one corresponding to the UNC5H2/DAPk fractions (400-1000kDa)), it remains detected into these two picks when netrin-1 was added (Fig.4C). Together, these data support the overall following model: in the presence of netrin-1, UNC5H2 is in closed conformation that prevents the adequate recruitment of the PP2A complex, while in the absence of netrin-1, UNC5H2 intracellular domain opens, allowing PP2A recruitment to the UNC5H2/DAPk complex.

PP2A mediates dephosphorylation of DAPk induced by UNC5H2.

Because the loss of DAPk autophosphorylation is a pre-requisite for DAPk activation (Bialik and Kimchi, 2006) and because this dephosphorylation occurs upon netrin-1 withdrawal in UNC5H2 expressing cells (Llambi et al., 2005), we investigated whether PP2A may be required for DAPk dephosphorylation. As a first approach, PP2A activity was increased by overexpression of the catalytic subunit and as shown in Fig.5A, forced PP2A activation is associated with the reduction of DAPk serine 308 phosphorylation. Conversely, when PR65β was knocked down in HEK293T cells by siRNA or when the cells were exposed to okadaic acid, DAPk serine 308 phosphorylation was enhanced (Fig.5B). We then expressed UNC5H2 and DAPk in HEK293T cells and analyzed DAPk p-S308 after PR65β silencing. As shown in Fig.5C, while transfection of UNC5H2 induces a decrease in the number of p-S308 cells, this decrease is not detected when HEK293T cells were transfected with PR65β siRNA.

Similarly, when netrin-1 was inhibited by a siRNA approach in the netrin-1 expressing H358 cells, less cells were stained with p-S308 specific antibody while this was not observed upon co-transfection with PR65β siRNA (Suppl. Fig.3). Altogether these data support the view that in the absence of netrin-1, PP2A is recruited to the UNC5H2/DAPk complex and mediates the dephosphorylation of DAPk.

CIP2A is an inhibitor of UNCH2-induced DAPk activation.

It was recently reported a novel PP2A regulator named CIP2A. CIP2A was reported to interact with PR65 and was shown to negatively repress PP2A activity in various cancer cells (Junttila et al., 2007). We thus investigated whether CIP2A may be involved in the regulation of UNC5H2-induced death signaling. Co-immunoprecipitation in CIP2A/UNC5H2 HEK293T transfected cells, showed that CIP2A was weakly pulled down with UNC5H2 in the absence of netrin-1 (Fig.6A). However, when netrin-1 was added, a clear increased interaction between UNC5H2 and CIP2A was observed (Fig.6A), thus suggesting that netrin-1 presence is associated with increased recruitment of this PP2A inhibitor. We then analyzed whether CIP2A thus antagonizes PP2A-mediated dephosphorylation of DAPk and UNC5H2-induced apoptosis. As shown in Figure 6B, forced expression of CIP2A in HEK293T cells significantly prevents UNC5H2–induced apoptosis while it had no effect on Ptc-induced apoptosis. Reversibly, when CIP2A was silenced by a siRNA strategy (Fig.6C and Suppl. Fig.4A), it was associated with an increase in UNC5H2-induced apoptosis (Suppl. Fig.4B). We thus analyzed DAPk p-S308 in UNC5H2/DAPk transfected HEK293T cells after CIP2A silencing. As shown in Figure 6D, CIP2A siRNA transfection was associated with an

increased inhibition by UNC5H2 of DAPk autophosphorylation. Altogether these data supports the view than CIP2A is a negative regulator of UNC5H2-induced apoptosis because it is recruited to UNC5H2 when netrin-1 is present and it inhibits PP2A-mediated dephosphorylation of DAPk.

PP2A activity is required for the dependence receptor activity of UNC5H2 during developmental angiogenesis.

To evaluate the importance of PP2A/PR65β in UNC5H2 pro-apoptotic activity in vivo, we took advantage of the recent observation that netrin-1 acts as a survival factor for endothelial cells during developmental angiogenesis by inhibiting UNC5H2 (Castets et al., 2009). Along this line, we first observed that transfection with a PR65β siRNA promotes in vitro survival of HUAEC endothelial cells (Fig.7A) similarly to what was observed upon treatment with netrin-1 or with inhibition of UNC5H2 by siRNA (Fig.7B and (Castets et al., 2009)). We then investigated whether the defects on angiogenesis observed in vivo upon netrin-1 disruption, that we have shown to result from UNC5H2-induced endothelial cell apoptosis, could be rescued by inhibition of PR65β. During zebrafish development, silencing of *netrin-1a*, using different *netrin-1a* morpholinos, is associated with vessels development defects (Lu et al., 2004; Wilson et al., 2006). We have shown that these vessel defects observed upon *netrin-1* perturbation can be blocked either by a treatment with a caspase inhibitor or the disruption of UNC5H2 (Castets et al., 2009). Using fli:egfp transgenic zebrafish -a transgenic model targeting the expression of GFP specifically in blood vessels (Lawson and Weinstein, 2002)- we

indeed confirmed at 30-36 hours post-fertilization (hpf) that *netrin-1a* silencing using a translation-blocking morpholino (tsl-netrin-1a), led to the disorganization of intersegmental vessels (ISVs) in 57.1% of the embryos injected and to the absence of the dorsal anastomotic vessel (DLAV) (Fig. 7B). As described previously (Castets et al., 2009), we observed that simultaneous injection of *UNC5H2* morpholinos was able to correct the defects induced by tsl-netrin-1a morpholino injection (not shown). We then analyzed the effect of PR65β morpholino on the tsl-netrin-1a blocking morpholino associated vessel defects. As shown in Fig.7B, PR65β morpholino significantly reversed the ISVs defects associated with *netrin-1a* silencing ($p<0.001$), thus demonstrating that in vivo, UNC5H2 pro-apoptotic activity is dependent on PP2A activation. Along this line, while *netrin-1a* silencing is associated with increased caspase activity (Castets et al., 2009), PR65β morpholino blocks this effect (Fig.7C) similarly to what was previously observed with UNC5H2 or DAPk morpholinos (Castets et al., 2009). Thus, PP2A as a regulator of UNC5H2-mediated cell death is implicated in angiogenesis regulation.

Discussion

By means of an unbiased siRNA screen, we have demonstrated here the implication of PP2A activity in the death signaling induced by the dependence receptor UNC5H2. A model predicted from the data presented above is depicted in Fig.8: An interaction between UNC5H2 and DAPk, which requires their respective death domains, occurs independently of netrin-1 (Llambi et al., 2005). However, adequate association of UNC5H2/DAPk with the PP2A complex that includes PR65β is negatively regulated by netrin-1. In the presence of netrin-1, the PP2A complex is repressed by the presence of CIP2A in the UNC5H2/DAPk complex and in this setting DAPk is auto-phosphorylated on serine 308 and as such remains inactive. Netrin-1 withdrawal is then associated with the release of CIP2A and the recruitment of PP2A to the UNC5H2/DAPk complex leading to PP2A activation. Such activation allows the dephosphorylation of DAPk on serine 308, leading to the described autoactivation of the catalytic activity of DAPk and to apoptosis. The activation process appears to take place in lipid rafts probably because other proteins localized to lipid rafts are important to support this dephosphorylation. One may then wonder how the loss of interaction of UNC5H2 with its ligand is associated with the recruitment of PP2A to the vicinity of the UNC5H2 intracellular domain and of DAPk. One view is that in the presence of netrin-1, UNC5H2 has been shown to multimerize (Mille et al., 2009a) and the multimerization of the intracellular domain of UNC5H2 may prevent the recruitment of PP2A because of steric

hindrance. Alternatively it has been demonstrated that in non-pro-apoptotic conditions, the intracellular domain of UNC5H2 forms a structural supra-module that masks and inhibits the death domain of UNC5H2 (Wang et al., 2009). It may then be tempting to speculate that the presence of netrin-1 prevents PP2A recruitment because of this inhibitory structural supramodule, while netrin-1 withdrawal is associated with the opening of this supramodule and the unmasking of the pro-apoptotic death domain. To comfort this view, we show here that a mutant of UNC5H2 maintained in an opened conformation is associated in a large size complex with PR65β both in absence or presence of netrin-1.

Our data thus support the implication of PP2A as a cell death inducer via the activation of UNC5H2-induced apoptosis. PP2A activity has been suggested to be an important mediator of cell death (Garcia et al., 2003) even though so far this implication is mainly indirect as it has been demonstrated via the use of pharmacological inhibitors that are rather supportive of the requirement of a PP2A-like activity. Here we provide the first genetic evidence both in cell culture and in zebrafish of the importance of PP2A in a cell death process. Of interest, a PP2A-like activity has been proposed to be implicated in the two classic pathways for caspase-dependent apoptosis –i.e., the extrinsic pathway with the effect of a PP2A-like activity in DISC formation (Chatfield and Eastman, 2004) and the intrinsic pathway with the demonstrated effect of PP2A on Bcl-2 or Bax (Chatfield and Eastman, 2004; Deng et al., 2009). PP2A-like activity has also been implicated in the activation of DAPk in ER stress-induced caspase-independent cell death (Gozuacik et al., 2008). Here we show that PP2A is directly implicated in the dependence receptor pathway.

Two questions however arise from this work. First, we may wonder whether the implication of PP2A is a general phenomenon for all dependence receptors or whether this is restricted to the ones using DAPk to trigger apoptosis. Along this line not only the UNC5H2 receptor but the RGM dependence receptor neogenin has been shown to interact with DAPk and to require DAPk to trigger apoptosis (Fujita et al., 2008). Yet, this is probably not a general requirement as the dependence receptor Patched appears to trigger apoptosis independently of PP2A-activity (Fig.2). Second, we may wonder what is the exact nature of the PP2A complex recruited to UNC5H2 which is able to dephosphorylate DAPk. It is indeed widely accepted that PP2A is not a single protein complex but actually regroups many different protein complexes that mainly depend on the type of PR65 scaffold proteins and of regulatory β subunits. Regarding the PR65 isoforms, even if a larger literature exists on PR65α compared to PR65β, and even though most of the reports present PR65α as the most abundant isoform, we failed to identify any implication of PR65α in UNC5H2-induced apoptosis. This may have some links with the fact that similarly to UNC5H or DAPk, PR65β appears to have a central regulatory role in cancer (Eichhorn et al., 2008). Regarding the regulatory β subunits, to date 15 genes have been identified in the human genome that encodes at least 26 different alternative transcripts and splice forms representing the β subunits of the PP2A holoenzyme (Eichhorn et al., 2008). Future work will then have to define what is (are) the preferential subunit(s) required for UNC5H2-dependent-PP2A-mediated activation of DAPk. Of interest, our work has shown the implication of one important negative regulator of PP2A. We have shown that CIP2A, known to interact with PR65, is

interacting with UNC5H2 and prevents UNC5H2-induced apoptosis probably because it inhibits UNC5H2-dependent PP2A activation. Intriguingly, CIP2A appears to be up-regulated in wide fraction of cancer cell lines. CIP2A was thus proposed to play a pro-oncogenic role by stabilizing c-Myc via the inhibition of PP2A(Junttila et al., 2007). Whether CIP2A acts as an oncogene by preventing UNC5H-mediated apoptosis, that has been proposed to act a safeguard mechanism against tumor progression (Bernet et al., 2007; Mazelin et al., 2004; Mehlen and Puisieux, 2006), remains now to be investigated.

Along this line, a series of reports have shown the causal role of PP2A inhibition in cellular transformation and cancer progression (Arroyo and Hahn, 2005) (Junttila et al., 2007; Sablina et al., 2007). Thus, the determination of the PP2A protein complex regulating UNC5H2-dependent DAPk activation is not only of interest for basic research but may also represent an interesting input for therapeutic strategies. The pair netrin-1/UNC5H has indeed recently emerged as a key player in cancer progression (Bernet et al., 2007; Mazelin et al., 2004). In particular, it has been shown that numerous types of cancer have gained an autocrine production of netrin-1 as a selective advantage for growth (Delloye-Bourgeois et al., 2009a; Delloye-Bourgeois et al., 2009b; Fitamant et al., 2008). The overall view is that this netrin-1 over-expression maintains survival of tumor epithelial cells by blocking UNC5H-mediated cell death. In this respect developing an agonist of the UNC5H/PP2A interaction, an antagonist of UNC5H/CIP2A or more generally an activator of the functional PP2A complex involved in mediating DAPk dephosphorylation could turn as a powerful anti-tumor compound.

Interestingly, the netrin-1/UNC5H2 pair not only controls survival of epithelial tumor cell but also of endothelial cells. Indeed, netrin-1 was recently proposed to play an important role in embryonic and pathological angiogenesis (Cirulli and Yebra, 2007; Lu et al., 2004; Wilson et al., 2006). However, data reported led to the apparently contradictory conclusions that netrin-1 is either a pro- or an anti-angiogenic factor. We recently proposed to reconcile these apparent opposing observations by demonstrating that netrin-1 acts as a survival factor for endothelial cells, blocking the pro-apoptotic effect of the dependence receptor UNC5H2 and its downstream death signaling effector, the DAPk(Castets et al., 2009). Along the same line, we show here that in the setting of endothelial cell apoptosis during angiogenesis, PP2A is required for UNC5H2-induced apoptosis. This has dual implications. One, this is the first description of PP2A involvement during angiogenesis regulation. Second, even though the role of PP2A has been shown here only during developmental angiogenesis, it is tempting to speculate that it may have a similar role during pathological angiogenesis. As a consequence, targeting PP2A/UNC5H interaction or PP2A activity in tumors with autocrine netrin-1 expression might have an impact not only on the survival of tumor epithelial cells but also of blood vessels that irrigate the tumor. PP2A or PP2A/UNC5H interaction would then appear as appealing targets for anti-cancer therapy.

Material and Methods:

Cell culture and transfection

HEK293T and Cal51 cells were grown in DMEM (Invitrogen), supplemented with 10% FBS (Fetal Bovine Serum, Cambrex). H358 cells were grown in RPMI 1640 glutamax (Invitrogen) supplemented with 10% FBS. SiRNA and plasmid contructs (UNC5H2-HA, DAPk-FLAG, Netrin-1 and UNC5H2-V619Q mutant) were transfected using respectively Lipofectamine 2000 and Lipofectamine Plus Reagent according to manufacturer's instructions (Invitrogen).

Lentivirus library and Cal51 infection

8.5K Lentivirus Library was obtained from System Bioscience. This library encodes for shRNAs fused to GFP and encapsulated in FIV (Feline Immunodeficiency virus) pseudotyped targeting 8500 human genes. MOI (Multiplicity of infection) of Cal51 cell line was determined using control pFIV-cop-GFP vector provided. Cal51 were then infected (MOI=2) with the lentivirus library. GFP expression was checked 72h post-infection, and cells were treated with DCC-5Fbn at 0.8μg/mL for 72h. Surviving clones were isolated, amplified and their resistance to DCC-5Fbn induced cell death was checked by MTT assay.

Cell Death assays

DCC-5Fbn decoy peptide was produced as described before (Delloye-Bourgeois et al., 2009a; Fitamant et al., 2008). MTT assay were performed on Cal51 clones cultured in serum free media in 96-well plates using CellTiter96 Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega), which is based on a colorimetric reaction measuring mitochondrial activity. Caspase-3 activity was performed as described before (Llambi et al., 2005; Tauszig-Delamasure et al., 2007) using the Ac-DEVD-AFC substrate assay (Gentaur, Belgium). TUNEL immunostaining was performed using TUNEL assay kit (Roche) on fixed and permeabilized cells (4% Paraformaldehyde, PBS1x/Triton0.2%) as described previously (Llambi et al., 2005; Tauszig-Delamasure et al., 2007). Biotinylated DNA's extremities were revealed using Cy-3 coupled Streptavidine (Jackson Immunoresearch) at a dilution range of 1:1000.

Immunostaining

Before immunostaining, cells were cytospined, fixed 20 minutes in 4% paraformaldehyde and permeabilized in PBS1x/Triton0.2%. PR65β (Santa Cruz, 1:250), DAPk (Sigma, 1:200) and phosphoserine-308 DAPk (Sigma, 1:200) staining were realized using specific antibodies. Fluorescence labelings were obtained using corresponding secondary antibodies coupled to alexxa 488 at a dilution of 1:400 (Jackson Immunoresearch).

Co-localization assay

HEK293T cells were cultured on coverslips and transfected with DAPk-Flag, UNC5H2-HA (Llambi et al., 2005) and netrin-1 or the corresponding pcDNA-3 empty vector. Cells

were fixed using 4% paraformaldehyde 48h post transfection and permeabilized using PBS1x/Triton0.2%. Cells were then labeled using anti-HA, anti-Flag or PR65β antibodies and nucleus were labelled with Dapi. Images were obtained by confocal microscopy and analysed using ImageJ software.

Immunoprecipitation

Immunoprecipitation were carried out on HEK 293T cells transfected with UNC5H2-HA- and DAPk-FLAG constructs, as described previously (Llambi et al., 2005). Briefly, HEK293T cells were lysed in 50 mM HEPES pH 7.6, 125 mM NaCl, 5 mM EDTA and 0.1% NP-40 in the presence of proteases inhibitors, and further incubated with either anti-FlagM2, anti-HA (Sigma) or anti-PR65β (Santa Cruz) and protein A-Sepharose (Sigma) to pull down UNC5H2 or DAPk or PR65β. UNC5H2 or DAPk interaction with PR65β was then analysed on western-blot. For *in vivo* immunoprecipitation, mice brains from OF1 adult mice (Charles River Laboratories) were dissected, cut in small pieces and lysed in buffer described above before sonication. Immunoprecipitations were performed using anti-UNC5H2, anti-PR65β or control antibodies using *μ*MACS Protein G MicroBeads system (Miltenyi Biotec).

Gel Filtration

HEK293T cells were transfected with DAPk-FLAG and UNC5H2-HA or UNC5H2 V619Q expressing constructs, and with pcDNA3 or Netrin-1 expressing vectors. Cells were collected 48h post transfection, washed with PBS1x, lysed as described for immunoprecipitation 1h at +4°c and sonicated. Supernatants of each lysate were

collected and used to perform size-exclusion chromatography on High PrepTM SephacrylTM S300 (HR 16/60, Amersham) using an FPLC protein purification system (Biologic HR, Biorad). Proteins were separated with the lysis buffer. Column was calibrated with protein standards (29kDa-2000kDa) according to manufacturer's instructions (Sigma). Fractions were analysed on Criterion XT Precast gels (Bis-Tris 4-12%; Biorad) by western blotting. Aliquots from the 7-12 fractions were also pooled to perform co-immunoprecipitation experiments as described above.

PP2A activity assay

PP2A activity was measured using Active PP2A DuoSet IC kit (R&D system). Transfected HEK293T cells were collected and lysed. 96 wells plate (Maxisorp, Nunc) were coated with PP2A antibody and blocked with PBS1x-BSA2% (Sigma). Lysates were then incubated for 3 hours at 4°C in coated well plates. Wells were washed and the quantity of Free-Phosphate released by the phosphorylated peptide provided in each well was finally revealed by a colorimetric reaction using malachite green reagent according to manufacturer's instructions (R&D system).

Quantitative RT-PCR

Total mRNA were extracted from cells or zebrafish using Nucleospin RNAII kit (Macherey-Nagel) and 1 μg was reverse-transcribed using the iScript cDNA Synthesis kit (Bio-Rad). Real-time quantitative RT-PCR was performed on a LightCycler 2.0 apparatus (Roche) using the Light Cycler FastStart DNA Master SYBERGreen I kit (Roche). Oligonucleotides sequences are available on request.

Lipid raft disruption and isolation of low-density Triton X-100-insoluble caveolin-rich lipid rafts

HEK293T cells were treated with methyl-β-cyclodextrin (8mM) or xylazine (5μg/μl) as a control for 1 hour. For isolation of the lipid-raft associated proteins, cells were scraped on ice in 1 ml of ice-cold lysis buffer (25mM MES pH 6.5, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1mM Na3VO4, 1mM Na3P2O7) supplemented with protease inhibitors. Following Dounce homogenization, extracts were adjusted to 40% (w/v) sucrose and loaded on the bottom of a discontinuous 30% (w/v) to 5% (w/v) sucrose gradient. The tubes were then ultracentrifuged in a SW-41 rotor at 39000xg for 20 h at 4°C. Ten fractions were collected from the top of the tube (fractions 1-3 were combined). Fractions 1 to 5 correspond to DRM (detergent-resistant membrane) while fractions 8 to 10 correspond to HF (heavy nonraft fraction). Samples from each of the fractions were subjected to SDS–PAGE and Western blot analysis.

Morpholino knock-down of zebrafish embryos

fli1:eGFP transgenic zebrafish embryos were collected and injected (between 1 to 4 cells stage) with netrin-1a translation blocking morpholino (Castets et al., 2009; Lu et al., 2004) and/or PR65β morpholinos (GeneTools design), at 6 and 3 ng respectively. Morphology and vessels abnormalities were then assessed 36 hours post-fecundation by fluorescent microscopy. Caspase-3 activity measurement was performed as described previously (Castets et al., 2009).

Acknowledgments:

We wish to thank V. Laudet for precious advice and access to the IFR128 zebrafish platform, and SW Jang, K. Ye, F. Llambi and C. Maisse for technical advice. This work was supported by institutional grant from CNRS (PM), Centre Léon Bérard (PM), Université de Lyon (PM) and from the Ligue Contre le Cancer (PM), INCa (PM), ANR blanche (PM), STREP Hermione (PM) and APO-SYS (PM and AK). AK is the incumbent of Helena Rubinstein Chair of Cancer Research.

Correspondence and requests for materials should be addressed to P.M. (e-mail: mehlen@lyon.fnclcc.fr).

References

Ackerman, S.L., Kozak, L.P., Przyborski, S.A., Rund, L.A., Boyer, B.B., and Knowles, B.B. (1997). The mouse rostral cerebellar malformation gene encodes an UNC-5-like protein. Nature *386*, 838-842.

Arroyo, J.D., and Hahn, W.C. (2005). Involvement of PP2A in viral and cellular transformation. Oncogene *24*, 7746-7755.

Bernet, A., Mazelin, L., Coissieux, M.M., Gadot, N., Ackerman, S.L., Scoazec, J.Y., and Mehlen, P. (2007). Inactivation of the UNC5C Netrin-1 receptor is associated with tumor progression in colorectal malignancies. Gastroenterology *133*, 1840-1848.

Bialik, S., and Kimchi, A. (2006). The Death-Associated Protein Kinases: Structure, Function, and Beyond. Annu Rev Biochem.

Bordeaux, M.C., Forcet, C., Granger, L., Corset, V., Bidaud, C., Billaud, M., Bredesen, D.E., Edery, P., and Mehlen, P. (2000). The RET proto-oncogene induces apoptosis: a novel mechanism for Hirschsprung disease. Embo J *19*, 4056-4063.

Castets, M., Coissieux, M.M., Delloye-Bourgeois, C., Bernard, L., Delcros, J.G., Bernet, A., Laudet, V., and Mehlen, P. (2009). Inhibition of endothelial cell apoptosis by netrin-1 during angiogenesis. Dev Cell *16*, 614-620.

Chatfield, K., and Eastman, A. (2004). Inhibitors of protein phosphatases 1 and 2A differentially prevent intrinsic and extrinsic apoptosis pathways. Biochem Biophys Res Commun *323*, 1313-1320.

Chen, C.H., Wang, W.J., Kuo, J.C., Tsai, H.C., Lin, J.R., Chang, Z.F., and Chen, R.H. (2005). Bidirectional signals transduced by DAPK-ERK interaction promote the apoptotic effect of DAPK. EMBO J *24*, 294-304.

Cirulli, V., and Yebra, M. (2007). Netrins: beyond the brain. Nat Rev Mol Cell Biol *8*, 296-306.

Cohen, O., Feinstein, E., and Kimchi, A. (1997). DAP-kinase is a Ca2+/calmodulin-dependent, cytoskeletal-associated protein kinase, with cell death-inducing functions that depend on its catalytic activity. Embo J *16*, 998-1008.

Cohen, O., Inbal, B., Kissil, J.L., Raveh, T., Berissi, H., Spivak-Kroizaman, T., Feinstein, E., and Kimchi, A. (1999). DAP-kinase participates in TNF-alpha- and Fas-induced apoptosis and its function requires the death domain. J Cell Biol *146*, 141-148.

Deiss, L.P., Feinstein, E., Berissi, H., Cohen, O., and Kimchi, A. (1995). Identification of a novel serine/threonine kinase and a novel 15-kD protein as potential mediators of the gamma interferon-induced cell death. Genes Dev *9*, 15-30.

Delloye-Bourgeois, C., Brambilla, E., Coissieux, M.M., Guenebeaud, C., Pedeux, R., Firlej, V., Cabon, F., Brambilla, C., Mehlen, P., and Bernet, A. (2009a). Interference with netrin-1 and tumor cell death in non-small cell lung cancer. J Natl Cancer Inst *101*, 237-247.

Delloye-Bourgeois, C., Fitamant, J., Paradisi, A., Cappellen, D., Douc-Rasy, S., Raquin, M.A., Stupack, D., Nakagawara, A., Rousseau, R., Combaret, V.*, et al.* (2009b). Netrin-1 acts as a survival factor for aggressive neuroblastoma. J Exp Med *206*, 833-847.

Deng, X., Gao, F., and May, W.S. (2009). Protein phosphatase 2A inactivates Bcl2's antiapoptotic function by dephosphorylation and up-regulation of Bcl2-p53 binding. Blood *113*, 422-428.

Eichhorn, P.J., Creyghton, M.P., and Bernards, R. (2008). Protein phosphatase 2A regulatory subunits and cancer. Biochim Biophys Acta.

Eisenberg-Lerner, A., and Kimchi, A. (2007). DAP kinase regulates JNK signaling by binding and activating protein kinase D under oxidative stress. Cell Death Differ *14*, 1908-1915.

Feinstein, E., Kimchi, A., Wallach, D., Boldin, M., and Varfolomeev, E. (1995). The death domain: a module shared by proteins with diverse cellular functions. Trends Biochem Sci *20*, 342-344.

Fitamant, J., Guenebeaud, C., Coissieux, M.M., Guix, C., Treilleux, I., Scoazec, J.Y., Bachelot, T., Bernet, A., and Mehlen, P. (2008). Netrin-1 expression confers a selective advantage for tumor cell survival in metastatic breast cancer. Proc Natl Acad Sci U S A *105*, 4850-4855.

Forcet, C., Stein, E., Pays, L., Corset, V., Llambi, F., Tessier-Lavigne, M., and Mehlen,

P. (2002). Netrin-1-mediated axon outgrowth requires deleted in colorectal cancer-dependent MAPK activation. Nature *417*, 443-447.

Fujita, Y., Taniguchi, J., Uchikawa, M., Endo, M., Hata, K., Kubo, T., Mueller, B.K., and Yamashita, T. (2008). Neogenin regulates neuronal survival through DAP kinase. Cell Death Differ *15*, 1593-1608.

Furne, C., Rama, N., Corset, V., Chedotal, A., and Mehlen, P. (2008). Netrin-1 is a survival factor during commissural neuron navigation. Proc Natl Acad Sci U S A *105*, 14465-14470.

Furne, C., Ricard, J., Cabrera, J.R., Pays, L., Bethea, J.R., Mehlen, P., and Liebl, D.J. (2009). EphrinB3 is an anti-apoptotic ligand that inhibits the dependence receptor functions of EphA4 receptors during adult neurogenesis. Biochim Biophys Acta *1793*, 231-238.

Garcia, A., Cayla, X., Guergnon, J., Dessauge, F., Hospital, V., Rebollo, M.P., Fleischer, A., and Rebollo, A. (2003). Serine/threonine protein phosphatases PP1 and PP2A are key players in apoptosis. Biochimie *85*, 721-726.

Gozuacik, D., Bialik, S., Raveh, T., Mitou, G., Shohat, G., Sabanay, H., Mizushima, N., Yoshimori, T., and Kimchi, A. (2008). DAP-kinase is a mediator of endoplasmic reticulum stress-induced caspase activation and autophagic cell death. Cell Death Differ *15*, 1875-1886.

Gozuacik, D., and Kimchi, A. (2006). DAPk protein family and cancer. Autophagy *2*, 74-79.

Hong, K., Hinck, L., Nishiyama, M., Poo, M.M., Tessier-Lavigne, M., and Stein, E. (1999). A ligand-gated association between cytoplasmic domains of UNC5 and DCC family receptors converts netrin-induced growth cone attraction to repulsion. Cell *97*, 927-941.

Inbal, B., Cohen, O., Polak-Charcon, S., Kopolovic, J., Vadai, E., Eisenbach, L., and Kimchi, A. (1997). DAP kinase links the control of apoptosis to metastasis. Nature *390*, 180-184.

Janssens, V., and Goris, J. (2001). Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. Biochem J

353, 417-439.

Junttila, M.R., Puustinen, P., Niemela, M., Ahola, R., Arnold, H., Bottzauw, T., Ala-aho, R., Nielsen, C., Ivaska, J., Taya, Y.*, et al.* (2007). CIP2A inhibits PP2A in human malignancies. Cell *130*, 51-62.

Kawaguchi, K., Oda, Y., Saito, T., Yamamoto, H., Takahira, T., Tamiya, S., Iwamoto, Y., and Tsuneyoshi, M. (2004). Death-associated protein kinase (DAP kinase) alteration in soft tissue leiomyosarcoma: Promoter methylation or homozygous deletion is associated with a loss of DAP kinase expression. Hum Pathol *35*, 1266-1271.

Keino-Masu, K., Masu, M., Hinck, L., Leonardo, E.D., Chan, S.S., Culotti, J.G., and Tessier-Lavigne, M. (1996). Deleted in Colorectal Cancer (DCC) encodes a netrin receptor. Cell *87*, 175-185.

Lawson, N.D., and Weinstein, B.M. (2002). In vivo imaging of embryonic vascular development using transgenic zebrafish. Dev Biol *248*, 307-318.

Llambi, F., Causeret, F., Bloch-Gallego, E., and Mehlen, P. (2001). Netrin-1 acts as a survival factor via its receptors UNC5H and DCC. Embo J *20*, 2715-2722.

Llambi, F., Lourenco, F.C., Gozuacik, D., Guix, C., Pays, L., Del Rio, G., Kimchi, A., and Mehlen, P. (2005). The dependence receptor UNC5H2 mediates apoptosis through DAP-kinase. Embo J *24*, 1192-1201.

Lu, X., Le Noble, F., Yuan, L., Jiang, Q., De Lafarge, B., Sugiyama, D., Breant, C., Claes, F., De Smet, F., Thomas, J.L.*, et al.* (2004). The netrin receptor UNC5B mediates guidance events controlling morphogenesis of the vascular system. Nature *432*, 179-186.

Maisse, C., Rossin, A., Cahuzac, N., Paradisi, A., Klein, C., Haillot, M.L., Herincs, Z., Mehlen, P., and Hueber, A.O. (2008). Lipid raft localization and palmitoylation: identification of two requirements for cell death induction by the tumor suppressors UNC5H. Exp Cell Res *314*, 2544-2552.

Mazelin, L., Bernet, A., Bonod-Bidaud, C., Pays, L., Arnaud, S., Gespach, C., Bredesen, D.E., Scoazec, J.Y., and Mehlen, P. (2004). Netrin-1 controls colorectal tumorigenesis by regulating apoptosis. Nature *431*, 80-84.

Mehlen, P., and Bredesen, D.E. (2004). The dependence receptor hypothesis.

Apoptosis *9*, 37-49.

Mehlen, P., and Furne, C. (2005). Netrin-1: when a neuronal guidance cue turns out to be a regulator of tumorigenesis. Cell Mol Life Sci *62*, 2599-2616.

Mehlen, P., and Puisieux, A. (2006). Metastasis: a question of life or death. Nat Rev Cancer *6*, 449-458.

Mehlen, P., Rabizadeh, S., Snipas, S.J., Assa-Munt, N., Salvesen, G.S., and Bredesen, D.E. (1998). The DCC gene product induces apoptosis by a mechanism requiring receptor proteolysis. Nature *395*, 801-804.

Mehlen, P., and Thibert, C. (2004). Dependence receptors: between life and death. Cell Mol Life Sci *61*, 1854-1866.

Mille, F., Llambi, F., Guix, C., Delloye-Bourgeois C., Guenebeaud, C., Castro-Obregon, S., Bredesen, D.E., Thibert, C., and Mehlen, P. (2009a). Interfering with Netrin-1 receptors multimerization triggers apoptosis. Cell Death Differ *in press*.

Mille, F., Thibert, C., Fombonne, J., Guix, C., Corset, V., Reed, J., and Mehlen, P. (2009b). The Patched dependence receptor triggers apoptosis through a DRAL-TUCAN-caspase-9 complex. Nat Cell Biol *11, 739-741*.

Mourali, J., Benard, A., Lourenco, F.C., Monnet, C., Greenland, C., Moog-Lutz, C., Racaud-Sultan, C., Gonzalez-Dunia, D., Vigny, M., Mehlen, P.*, et al.* (2006). Anaplastic lymphoma kinase is a dependence receptor whose proapoptotic functions are activated by caspase cleavage. Mol Cell Biol *26*, 6209-6222.

Raveh, T., and Kimchi, A. (2001). DAP kinase-a proapoptotic gene that functions as a tumor suppressor. Exp Cell Res *264*, 185-192.

Sablina, A.A., Chen, W., Arroyo, J.D., Corral, L., Hector, M., Bulmer, S.E., DeCaprio, J.A., and Hahn, W.C. (2007). The tumor suppressor PP2A Abeta regulates the RalA GTPase. Cell *129*, 969-982.

Serafini, T., Colamarino, S.A., Leonardo, E.D., Wang, H., Beddington, R., Skarnes, W.C., and Tessier-Lavigne, M. (1996). Netrin-1 is required for commissural axon guidance in the developing vertebrate nervous system. Cell *87*, 1001-1014.

Shohat, G., Spivak-Kroizman, T., Cohen, O., Bialik, S., Shani, G., Berrisi, H., Eisenstein, M., and Kimchi, A. (2001). The pro-apoptotic function of death-associated protein

kinase is controlled by a unique inhibitory autophosphorylation-based mechanism. J Biol Chem *276*, 47460-47467.

Tang, X., Jang, S.W., Okada, M., Chan, C.B., Feng, Y., Liu, Y., Luo, S.W., Hong, Y., Rama, N., Xiong, W.C.*, et al.* (2008). Netrin-1 mediates neuronal survival through PIKE-L interaction with the dependence receptor UNC5B. Nat Cell Biol *10*, 698-706.

Tanikawa, C., Matsuda, K., Fukuda, S., Nakamura, Y., and Arakawa, H. (2003). p53RDL1 regulates p53-dependent apoptosis. Nat Cell Biol *5*, 216-223.

Tauszig-Delamasure, S., Yu, L.Y., Cabrera, J.R., Bouzas-Rodriguez, J., Mermet-Bouvier, C., Guix, C., Bordeaux, M.C., Arumae, U., and Mehlen, P. (2007). The TrkC receptor induces apoptosis when the dependence receptor notion meets the neurotrophin paradigm. Proc Natl Acad Sci U S A *104*, 13361-13366.

Thibert, C., Teillet, M.A., Lapointe, F., Mazelin, L., Le Douarin, N.M., and Mehlen, P. (2003). Inhibition of neuroepithelial patched-induced apoptosis by sonic hedgehog. Science *301*, 843-846.

Wang, H., Ozaki, T., Shamim Hossain, M., Nakamura, Y., Kamijo, T., Xue, X., and Nakagawara, A. (2008). A newly identified dependence receptor UNC5H4 is induced during DNA damage-mediated apoptosis and transcriptional target of tumor suppressor p53. Biochem Biophys Res Commun *370*, 594-598.

Wang, R., Wei, Z., Jin, H., Wu, H., Yu, C., Wen, W., Chan, L.N., Wen, Z., and Zhang, M. (2009). Autoinhibition of UNC5b revealed by the cytoplasmic domain structure of the receptor. Mol Cell *33*, 692-703.

Wilson, B.D., Ii, M., Park, K.W., Suli, A., Sorensen, L.K., Larrieu-Lahargue, F., Urness, L.D., Suh, W., Asai, J., Kock, G.A.*, et al.* (2006). Netrins Promote Developmental and Therapeutic Angiogenesis. Science, 313, 640-644.

Figure Legends

Figure 1: Identification of PR65β as a mediator of UNC5H-induced apoptosis using a shRNA screen.

A. Cell system used for UNC5H apoptotic signaling effectors screening. The breast cancer cell line Cal51, which express UNC5H and netrin-1, was incubated with the DCC-5Fbn decoy protein interfering with netrin-1 to induce UNC5H-mediated apoptosis. **B.** Lentiviral infection of Cal51 cell using a shRNA library and selection of survival clones, which are resistant to UNC5H-induced apoptosis. **C.** Sensitivity of Cal51 parental (WT) cell line and of a DCC-5Fbn-resistant infected clone to UNC5H-induced apoptosis after DCC-5Fbn treatment. Cell survival was quantified using MTT assay. Results are means+s.e.m (n=3). **D.** Efficiency of netrin-1 and PR65β siRNAs in Cal51 cell line. Quantification of mRNA levels was performed by Q-RT-PCR. **E.** Caspase-3 activation induced by netrin-1 silencing in Cal51 cells is significantly reduced by silencing of PR65β. Results are means+s.e.m (n=3). All P-values were obtained by Mann Whitney U-test.

Figure 2: Involvement of PR65β in UNC5H2-mediated apoptosis.

A,B. Efficiency of PR65β siRNA on PR65β at mRNA (A) and protein (B) levels in HEK293T cells. **A.** Quantitative RT-PCR showing specific decrease of PR65β mRNA level induced by PR65β siRNA. PR65α mRNA level was not modified by PR65β siRNA. Results are relative index to HPRT housekeeping gene expression level. **B**, Immunoblot

analysis of PR65β protein expression level, showing specific decrease after PR65β siRNA transfection. PR65α is not modified. β-Actin detection is used as a control. **C.** Silencing of PR65β prevents UNC5H2-induced apoptosis in HEK293T cells. TUNEL assay was used to monitor the effect of PR65β siRNA on apoptosis induced by transfection of the dependence receptors UNC5H1, UNC5H2 or Ptc. Results are means+s.e.m. percentage of TUNEL positive cells in each condition. Representative fields are presented on the right panel. **D.** Silencing of PR65β prevents caspase-3 activation induced by forced expression of UNC5H2 in HEK293T cells. Results are means+s.e.m of caspase-3 activity relatively to control (n=5). Transfection efficiency was controlled by western-blot and presented in the lower panel. **E.** UNC5H2 expression triggers activation of PP2A in HEK293T cells. PP2A activity was measured as described in the methods section. Results are means+s.e.m of five independent experiments. All P-values were calculated using Mann-Whitney U-test.

Figure 3: PR65β interacts with UNC5H2.

A. Immunoprecipitation of UNC5H2 and PR65β in HEK293T transfected cells. UNC5H2-HA was immunoprecipitated using α-HA antibody. Total and co-immunoprecipitated PR65β and PR65α were revealed by immunoblot using either a PR65α/β antibody or a specific antibody against PR65α. **B.** Colocalisation assay between endogenous PR65β (green) and transfected UNC5H2 (red) in HEK293T cells. Representative images obtained by confocal microscopy are shown. Fluorescence intensity profiles corresponding to white bars in merge panels are presented on the right for each condition. **C.** Immunoprecipitation of UNC5H2 (upper panel) or PR65β (lower

panel) in adult mice brain lysates. Co-immunoprecipitated PR65β (upper panel) or UNC5H2 (lower panel) were revealed by western blot using respectively PR65 or UNC5H2 antibodies.

Figure 4: UNC5H2, PR65β and DAPk form a protein complex localized in lipid rafts in the absence of netrin-1.

A. Co-localisation assay between PR65β and DAPk in HEK293T cells in the presence or absence of netrin-1. Cells were transfected with UNC5H2, PR65β, DAPk and with or without netrin-1. DAPk (red) and PR65β (green) were detected by immunostaining using specific antibodies. Representative images obtained by confocal microscopy are shown. **B.** DAPk and PP2A-C are partially localized in lipid rafts. HEK293T cells were treated with Methyl-β-Cyclodextrin (MβCD) or Xylazine (Xyl) as a control for 1 hour. Low-density detergent-insoluble membranes were fractionated by a discontinuous sucrose density gradient centrifugation as detailed in Materials and Methods. Fractions were collected, separated by SDS–PAGE and endogenous DAP-kinase (DAPk), PP2A-C and caveolin-1 (CAV-1) were detected by Western blot. HF (heavy nonraft fraction) and DRM (detergent-resistant membrane) are shown. **C**. Size exclusion assay supporting the PR65β recruitment in a UNC5H2/DAPK complex in absence of netrin-1 in HEK293T cells. Cells were transfected with UNC5H2-HA and DAPk-FLAG constructs with or without netrin-1. Lyzate was loaded on a size-exclusion chromatography. UNC5H2, DAPk and PR65β were detected by immunoblots on the different collected fractions. UNC5H2, DAPk and PR65β are detected in the high molecular weight fractions in the absence of netrin-1, whereas PR65β moves into small molecular weight fractions in the

presence of netrin-1. The lower panel represents fractions from a size exclusion chromatography performed from HEK293T transfected with a constitutively open UNC5H2 mutant, UNC5H2-V619Q. PR65 immunoblot is shown and indicates that such mutant triggers PR65 recruitment in high molecular weight fractions whatever netrin-1 was absent or present. **D.** High molecular weight fractions collected in C (UNC5H2/DAPk transfection without netrin-1) were used to perform PR65β immunoprecipitation. Anti HA and PR65 immunoblots show that PR65β interacts with UNC5H2 and DAPk.

Figure 5: PP2A induces dephosphorylation of DAPk.

A. DAPk-Ser308 phosphorylation was monitored by western blot on HEK293T cells transfected with the PP2A catalytic subunit (PP2Ac). Total DAPk level is shown. **B.** Okadaic acid (OA) and PR65β silencing by siRNA prevent DAPk dephosphorylation in HEK293T transfected cells. Total DAPk and β-Actin level are shown. **C.** DAPk-Ser308 phosphorylation was monitored by immunofluorescence on HEK293T cells transfected with UNC5H2 and/or PR65β siRNA. Immunofluorescence shows that PR65β silencing by siRNA blocks UNC5H2-mediated DAPk dephosphorylation. Representative pictures are shown on the right panel for each condition. Graphs represent means+s.e.m. of 3 independent experiments. P-values were calculated using a Mann-Whitney U-Test analysis.

Figure 6: The PP2A inhibitor CIP2A is implicated in UNC5H2-induced apoptosis modulation

A. CIP2A interacts with UNC5H2 in the presence of netrin-1 in HEK293T cells. HEK293T cells were transfected with UNC5H2 and/or CIP2A in the presence or not of netirn-1. Immunoprecipitation was performed using an HA antibody (to pull-down UNC5H2). Flag-CIP2A protein level in total and immunoprecipitated fractions was detected by western blot, using anti-Flag antibody. **B.** Forced expression of CIP2A in UNC5H2 transfected HEK293T cells antagonises UNC5H2-induced apoptosis. TUNEL staining shows that overexpression of CIP2A significantly reduces UNC5H2-induced apoptosis but has no effect on Ptc-induced apoptosis (observed after Ptc transfection). Inset represents respectively HA-immunoblot (UNC5H2, Ptc) and FLAG immunoblot (CIP2A) to show expression levels. β-Actin is used as a control. **C.** Efficiency of specific siRNA on CIP2A silencing in HEK293T. Quantitative RT-PCR shows effect of CIP2A siRNA on CIP2A mRNA level compared to HPRT housekeeping gene. **D.** CIP2A prevents UNC5H2/PP2A mediated DAPk-dephosphorylation. HEK293T cells were transfected with DAPk and UNC5H2 constructs together with scramble or CIP2A siRNA. Phospho-DAP kinase positive cells were then detected by immunofluorescence using specific DAPk-Ser308 antibody. Results are means+s.e.m of phospho-DAP kinase positive cells (n=3). Indicated P-values were calculated using Mann-Whitney U-test.

Figure 7: PP2A is involved in UNC5H2 pro-apoptotic signaling during angiogenesis.

A, UNC5H2, DAPk and PR65β siRNA silencing by siRNA are associated to a decrease in caspase-3 activity in HUAEC endothelial cells. Results are means+s.e.m. (n=3). All P-values are < to 0.03 (Student t-test). **B**. Silencing of PR65β using specific morpholinos

rescue vascular defects induced by netrin-1a silencing in *fli:eGFP* zebrafish embryos. Intersegmental vessels (ISV) presence was analysed at 30 hours post fecundation. Representative images of morpholinos-injected zebrafish embryos are shown for each condition. Percentage of zebrafish with ISV defect is indicated ($P<0.001$, Khi-2 test). **C**. PR65β silencing reduces caspase-3 activation induced by netrin-1a silencing in zebrafish embryos. Results are index means+s.e.m. of caspase-3 activity ($n=3$; $p<0.02$, Student t-test).

Figure 8: Model of PR65β/PP2A and CIP2A implication in DAPk-mediated UNC5H2-induced apoptosis.

In the presence of netrin-1, UNC5H2 receptor adopts a closed-conformation and interacts with an inactive/phosphorylated form of DAPk. Phosphorylation of DAPk is maintained by CIP2A, which interacts with UNC5H2 and inhibits PP2A. In absence of netrin-1, UNC5H2 adopts an opened-conformation and recruits PR65β/PP2A in a UNC5H2-DAPk complex. PR65β/PP2A recruitment leads to DAPk dephosphorylation and activation and thus to apoptosis induction.

Supplementary Figures legends:

Supplementary Table 1

Table presenting the 47 identified partners of UNC5H pro-apoptotic pathway with the

shRNA screening.

Supplementary Figure 1: P65β role in H358 cells

A. Cell death assay on H358 cells. Caspase-3 activity analysis revealing PR65β siRNA or Okadaic acid inhibitory effect on netrin-1 withdrawal-induced apoptosis. H358 cells were transfected with netrin-1 siRNA together or not with PR65β siRNA and treated (or not) with 5 nM of Okadaic acid. **B.** Quantitative RT-PCR showing transcriptional effect of PR65β and netrin-1 siRNAs on their target genes compared to HPRT housekeeping gene on H358 cell line.

Supplementary Figure 2: Inhibition of PR65β by a siRNA approach

A,B. Efficacy of PR65β siRNA on PR65β protein and global PP2A activity on HEK293T cells. **A.** Immunostaining revealing PR65 protein expression after PR65β siRNA transfection. **B.** ELISA-based PP2A activity measurement showing that PR65β siRNA is sufficient to decrease global PP2A activity. **C.** PR65β siRNA commercial mix has the same inhibitory effect on UNC5H2-induced cell death than the PR65β siRNA obtained from the lentivirus library. TUNEL staining revealing the inhibitory effect of another PR65β siRNA (commercial mix) on UNC5H2-induced apoptosis. Control immunoblots showing UNC5H2, PR65β and β-Actin expression.

Supplementary Figure 3: DAPk dephosphorylation is blocked by PR65β silencing in the H358 cell line.

Immunostaining against DAPk phospho-serine-308 was performed on H358 cells

transfected either with netrin-1 siRNA, PR65β siRNA or both siRNAs. Phosphorylation quantification was performed by microscopy analysis. Histograms represent means and from three independent experiments and scale bars indicate SEM. P-values were calculated by Mann-Whitney U-test.

Supplementary Figure 4: CIP2A expression inhibition by siRNA potentializes UNC5H2-induced apoptosis

A. Western blot showing CIP2A siRNA effect on HEK293T overexpressing CIP2A protein. β-actin protein level is shown. **B.** TUNEL staining showing that CIP2A inhibition potentializes UNC5H2-induced apoptosis but has no significant effect on Ptc-induced cell death. Histograms represent means and SEM obtained from 5 independent experiments and indicated P-values were calculated by Mann Whitney U-Test. Inset represents western blot controlling UNC5H2, Ptc and CIP2A level of expression compared to β-actin.

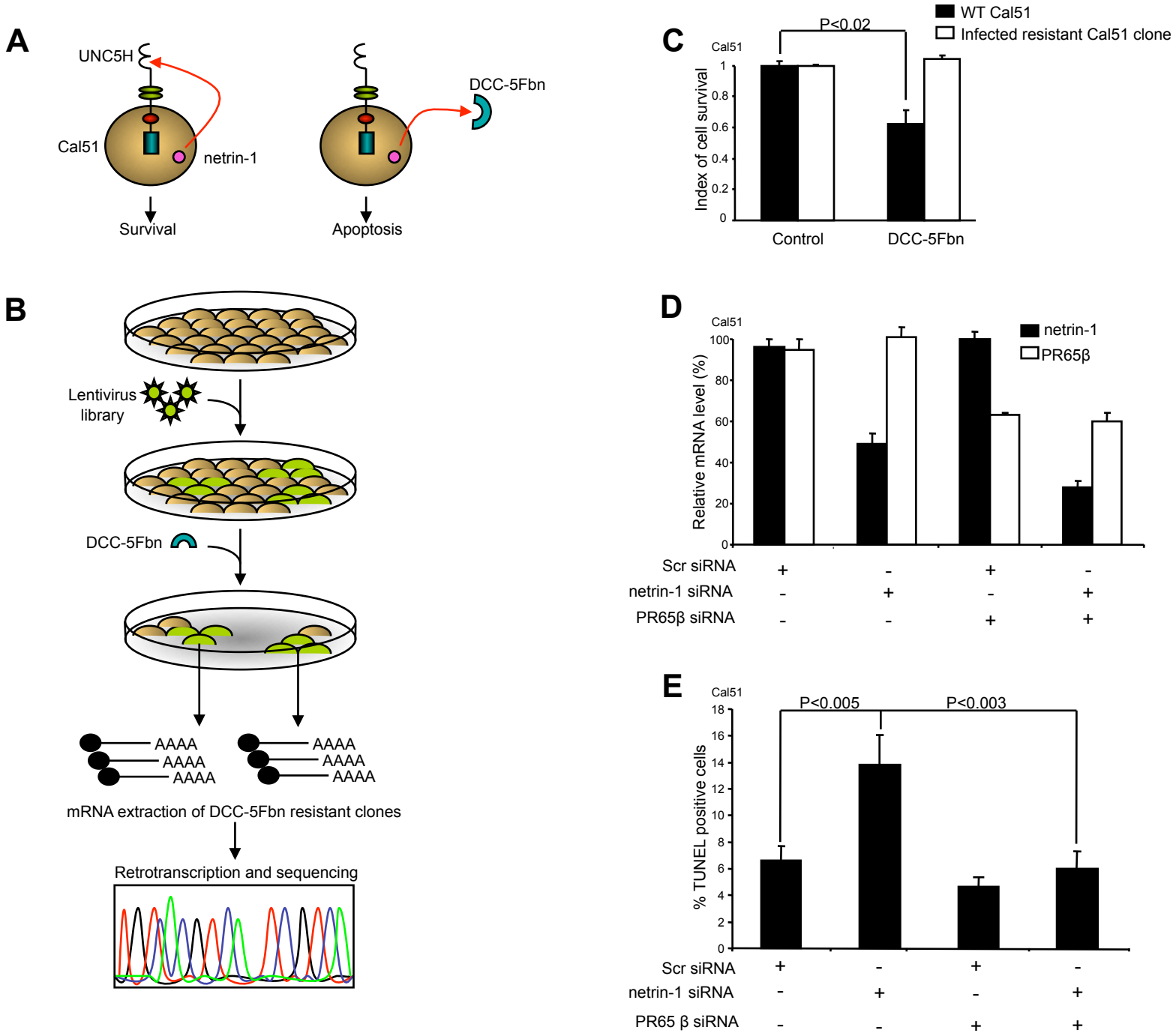

A
UNC5H
Cal51
netrin-1
Survival
DCC-5Fbn
Apoptosis
B
Lentivirus library
DCC-5Fbn
AAAA
AAAA
AAAA
AAAA
AAAA
AAAA
mRNA extraction of DCC-5Fbn resistant clones
Retrotranscription and sequencing
C
Cal51
P<0.02
WT Cal51
Infected resistant Cal51 clone
Index of cell survival
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
Control
DCC-5Fbn
D
Cal51
netrin-1
PR65β
Relative mRNA level (%)
100
80
60
40
20
0
Scr siRNA + - + -
netrin-1 siRNA - + - +
PR65β siRNA - - + +
E
Cal51
P<0.005
P<0.003
% TUNEL positive cells
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
Scr siRNA + - + -
netrin-1 siRNA - + - +
PR65 β siRNA - - + +

Figure 1

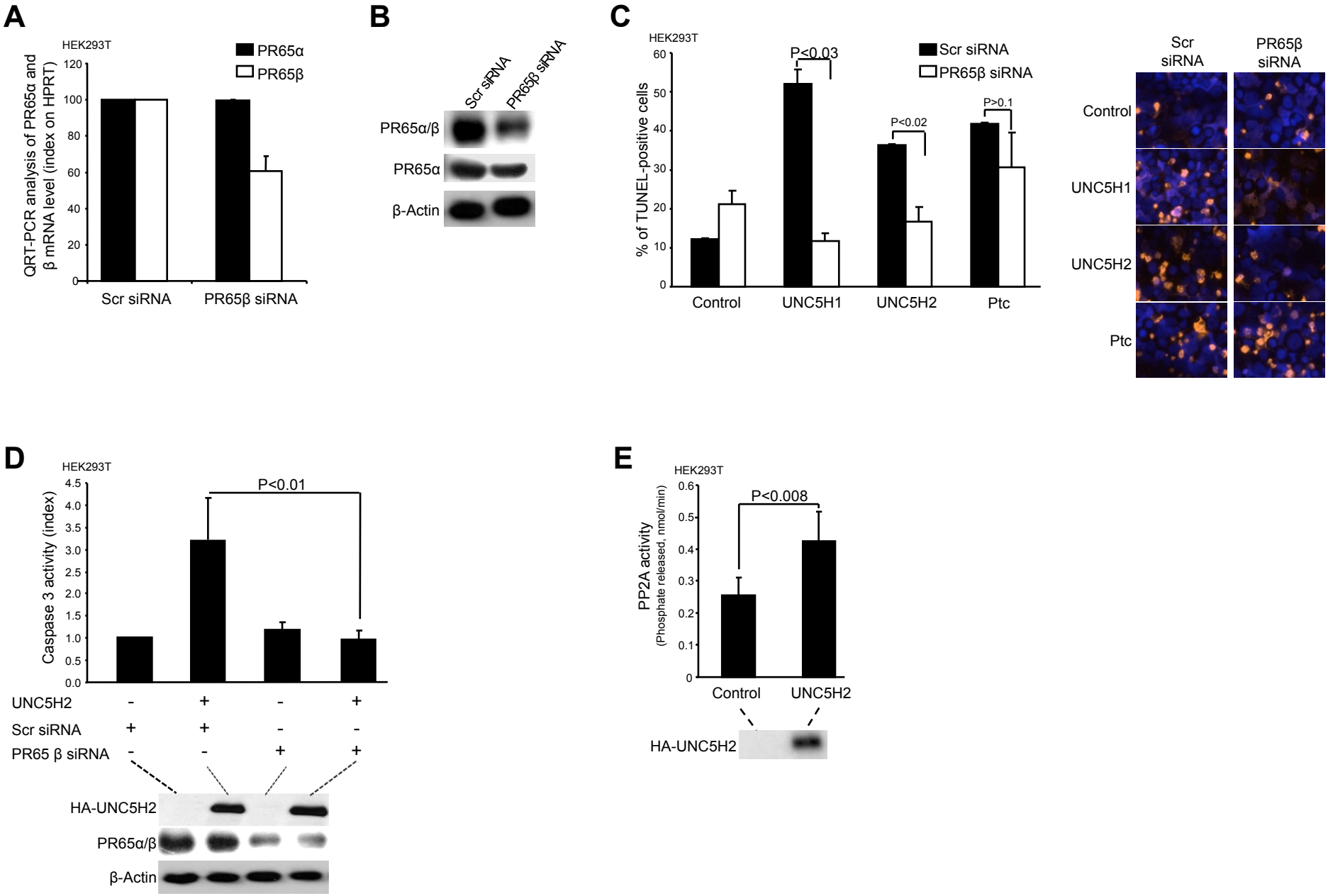

A
HEK293T
PR65α
PR65β
QRT-PCR analysis of PR65α and β mRNA level (index on HPRT)
120
100
80
60
40
20
0
Scr siRNA
PR65β siRNA
B
Scr siRNA
PR65β siRNA
PR65α/β
PR65α
β-Actin
C
HEK293T
Scr siRNA
PR65β siRNA
% of TUNEL-positive cells
60
50
40
30
20
10
0
P<0.03
P<0.02
P>0.1
Control
UNC5H1
UNC5H2
Ptc
Scr siRNA
PR65β siRNA
Control
UNC5H1
UNC5H2
Ptc
D
HEK293T
Caspase 3 activity (index)
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
P<0.01
UNC5H2 - + - +
Scr siRNA + + - -
PR65 β siRNA - - + +
HA-UNC5H2
PR65α/β
β-Actin
E
HEK293T
PP2A activity
(Phosphate released, nmol/min)
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
P<0.008
Control
UNC5H2
HA-UNC5H2

Figure 2

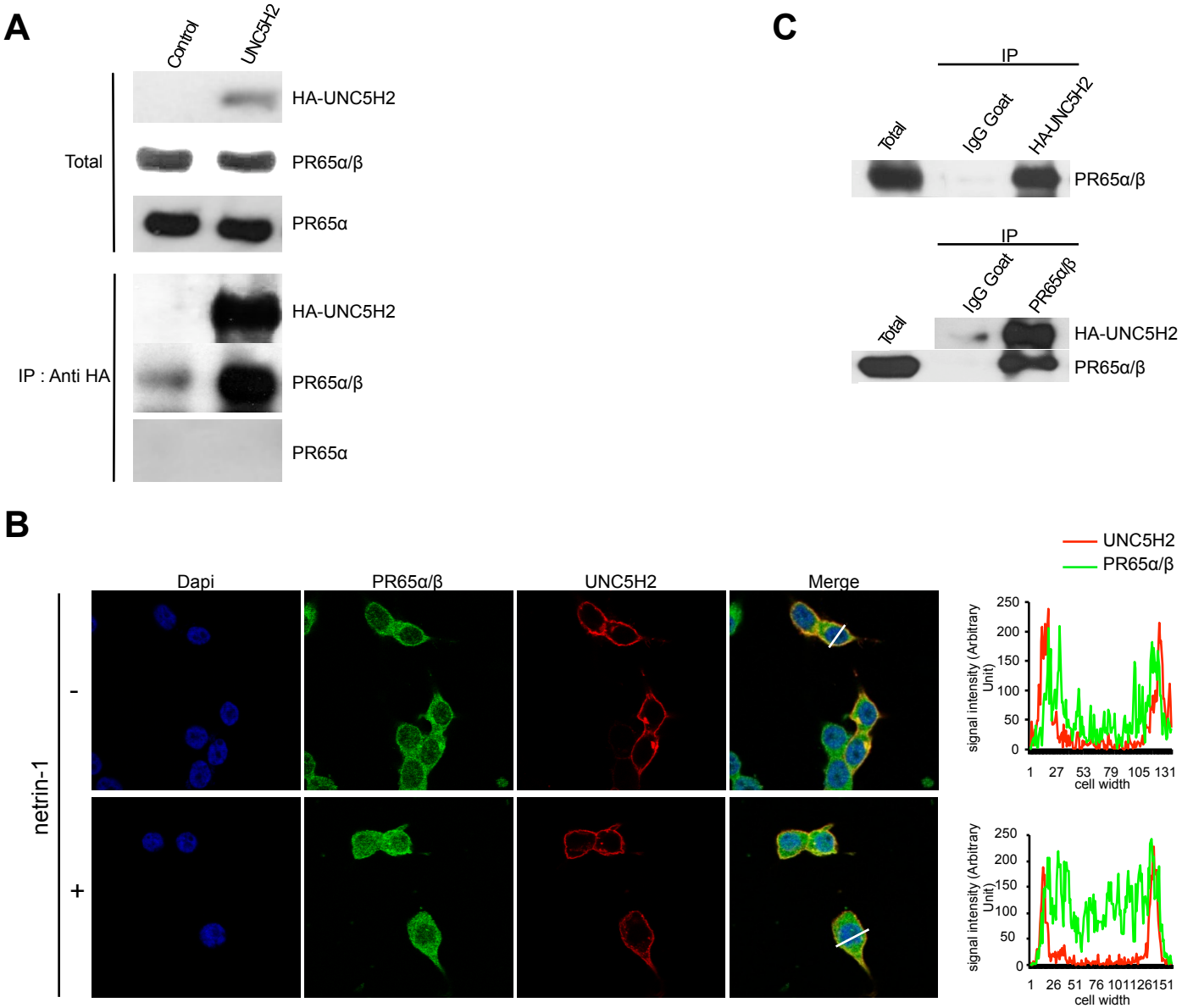

A
Control
UNC5H2
Total
HA-UNC5H2
PR65α/β
PR65α
IP : Anti HA
HA-UNC5H2
PR65α/β
PR65α
C
IP
Total
IgG Goat
HA-UNC5H2
PR65α/β
IP
Total
IgG Goat
PR65α/β
HA-UNC5H2
PR65α/β
B
Dapi
PR65α/β
UNC5H2
Merge
netrin-1
-
+
UNC5H2
PR65α/β
signal intensity (Arbitrary Unit)
cell width
signal intensity (Arbitrary Unit)
cell width

Figure 3

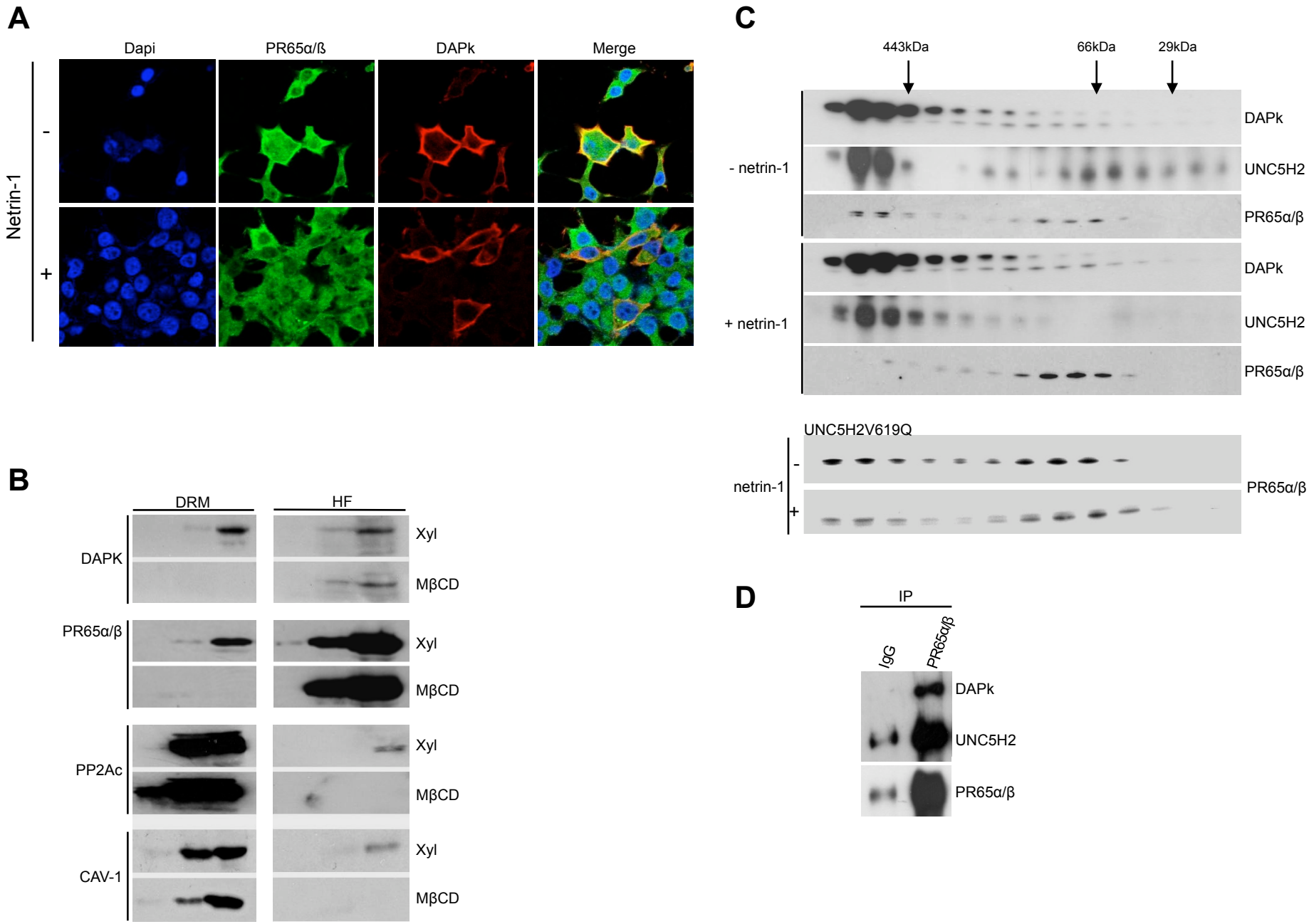

A
Dapi
PR65α/ß
DAPk
Merge
Netrin-1
-
+
B
DRM
HF
DAPK
PR65α/β
PP2Ac
CAV-1
Xyl
MβCD
C
443kDa
66kDa
29kDa
- netrin-1
+ netrin-1
DAPk
UNC5H2
PR65α/β
UNC5H2V619Q
netrin-1
D
IP
IgG
PR65α/β
DAPk
UNC5H2
PR65α/β

Figure 4

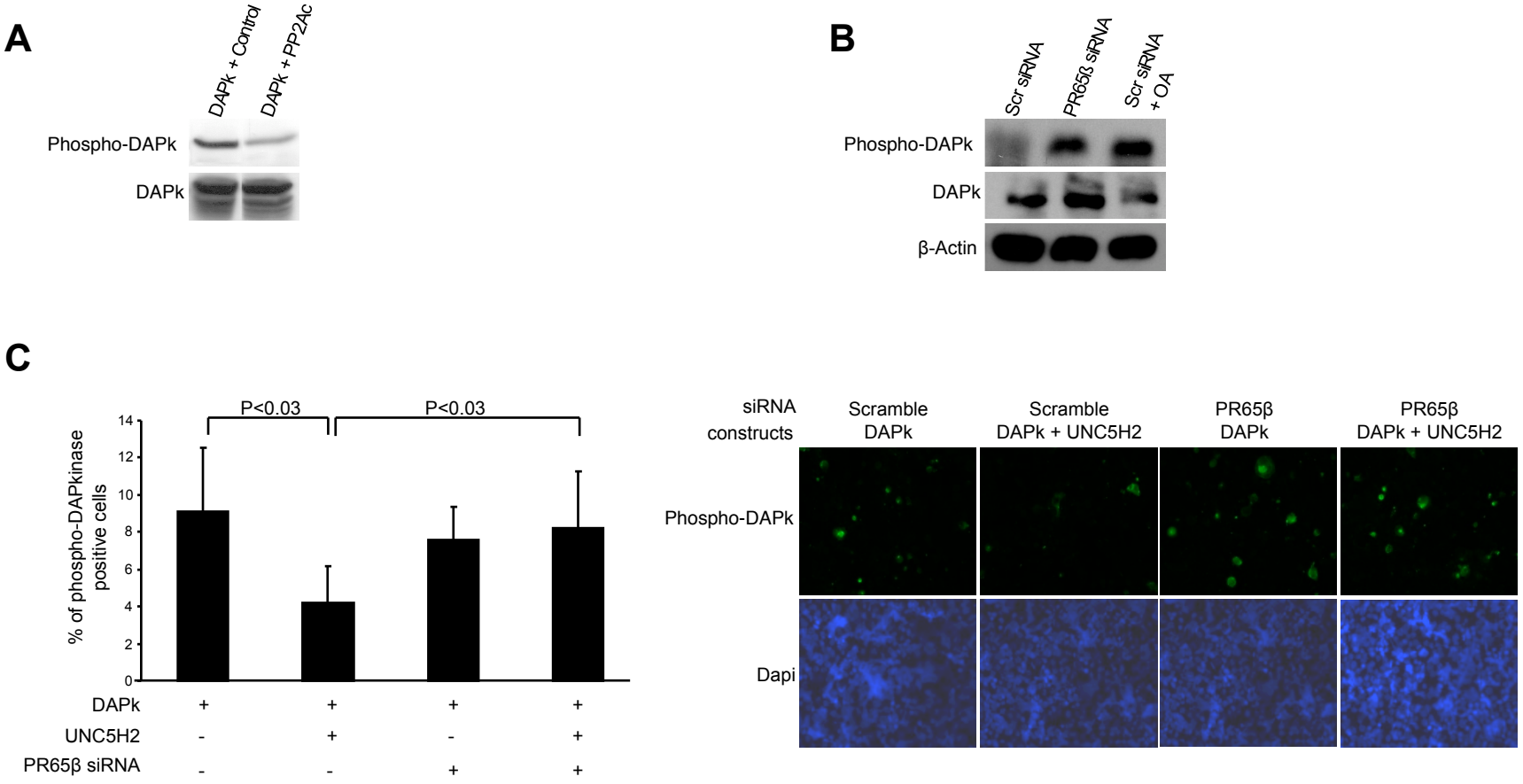

A
DAPk + Control
DAPk + PP2Ac
Phospho-DAPk
DAPk
B
Scr siRNA
PR65ß siRNA
Scr siRNA + OA
Phospho-DAPk
DAPk
β-Actin
C
P<0.03
P<0.03
% of phospho-DAPkinase positive cells
0
2
4
6
8
10
12
14
DAPk + + + +
UNC5H2 - + - +
PR65β siRNA - - + +
siRNA constructs
Scramble DAPk
Scramble DAPk + UNC5H2
PR65β DAPk
PR65β DAPk + UNC5H2
Phospho-DAPk
Dapi

Figure 5

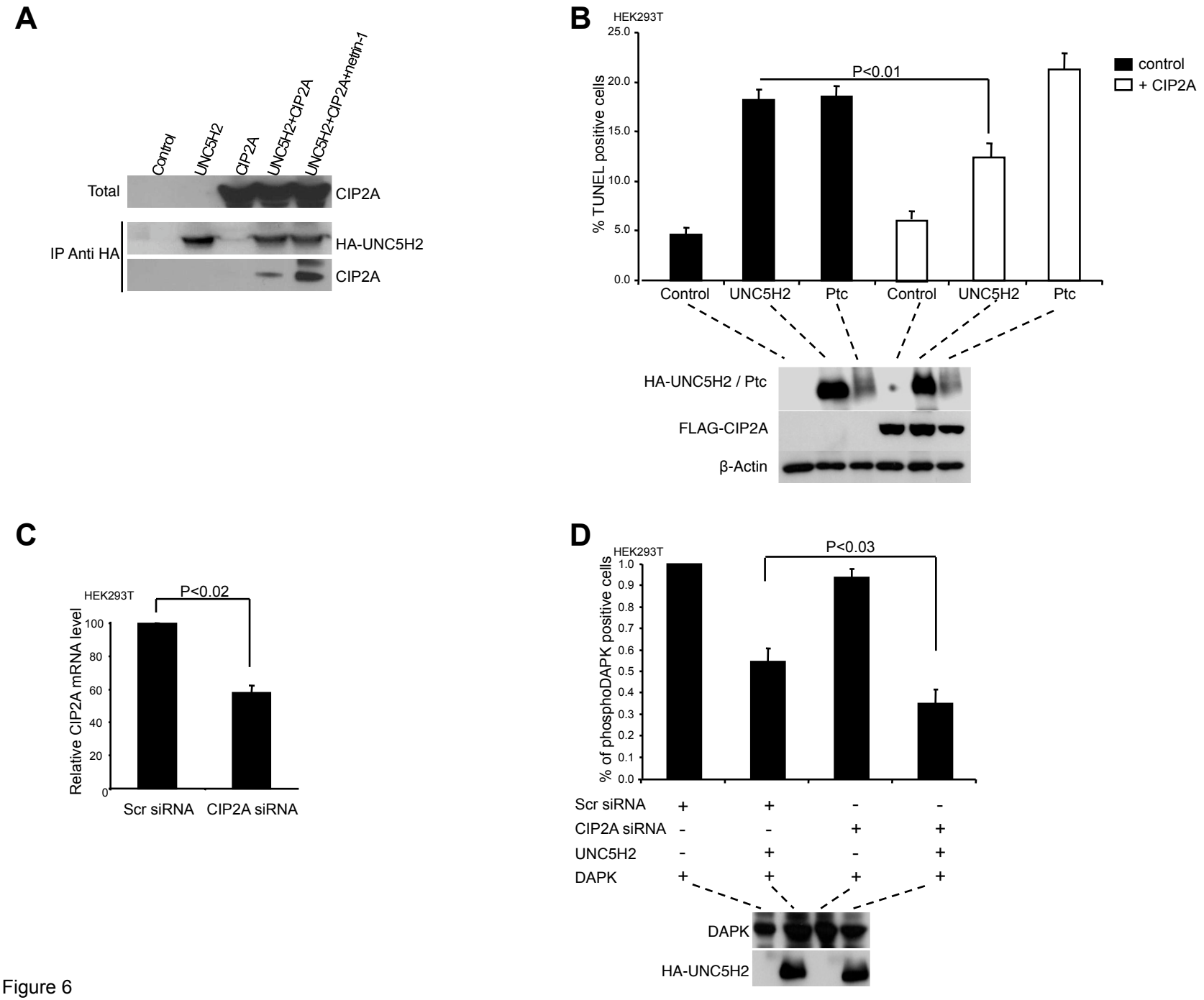
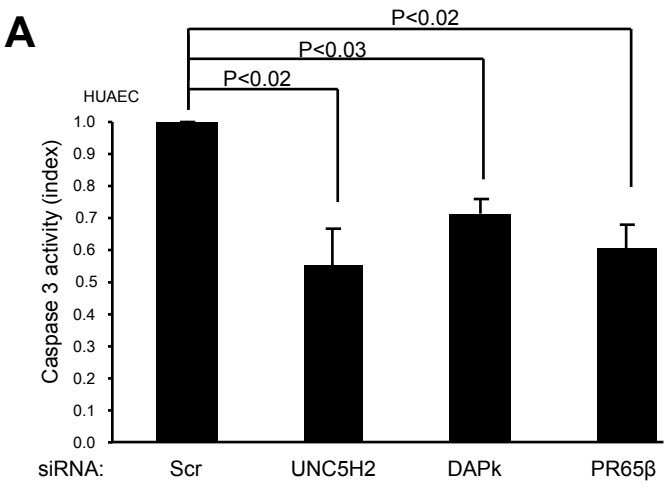
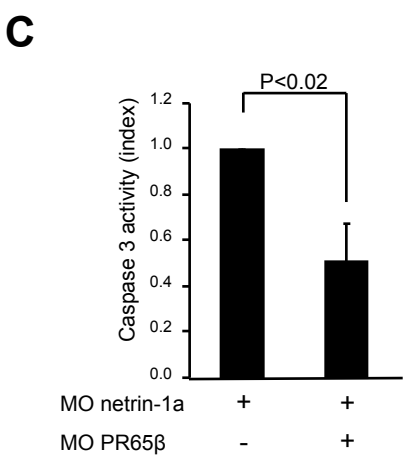

A
Control
UNC5H2
CIP2A
UNC5H2+CIP2A
UNC5H2+CIP2A+netrin-1
Total
CIP2A
IP Anti HA
HA-UNC5H2
CIP2A
B
HEK293T
% TUNEL positive cells
P<0.01
control
+ CIP2A
Control
UNC5H2
Ptc
Control
UNC5H2
Ptc
HA-UNC5H2 / Ptc
FLAG-CIP2A
β-Actin
C
HEK293T
P<0.02
Relative CIP2A mRNA level
Scr siRNA
CIP2A siRNA
D
HEK293T
P<0.03
% of phosphoDAPK positive cells
Scr siRNA
CIP2A siRNA
UNC5H2
DAPK
DAPK
HA-UNC5H2

Figure 6





B

	% of embryos with ISV defects
MO ctl	0.0
MO netrin-1a	57.1
MO netrin-1a + MO PR65β	30.6

P<0.001

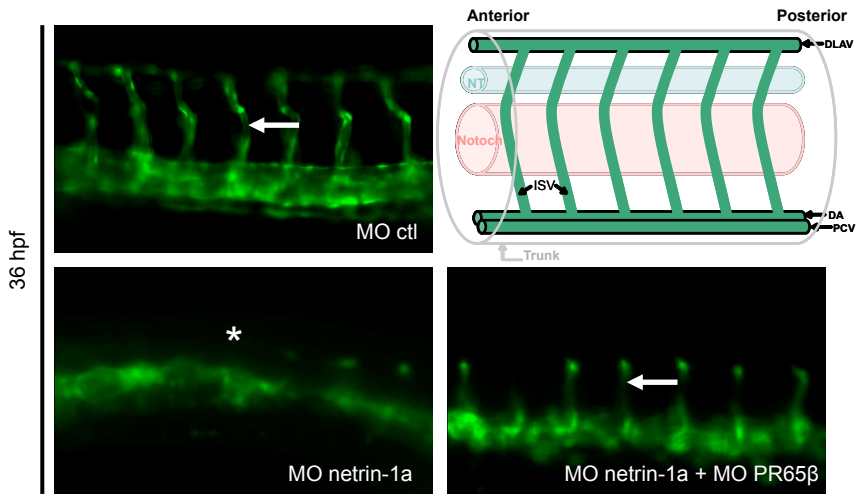


Figure 7

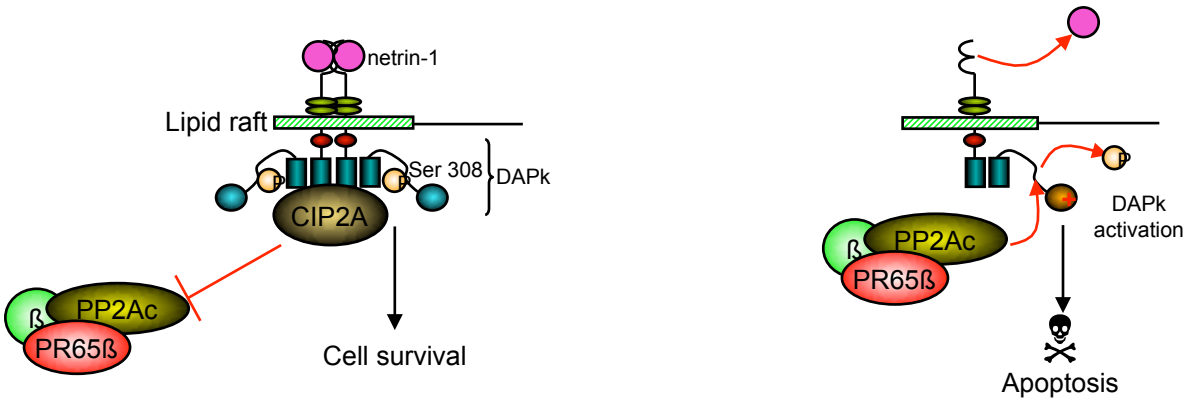
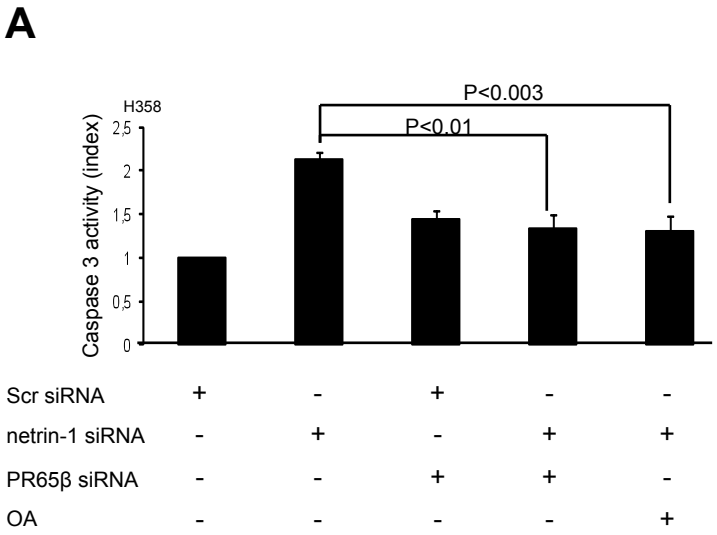
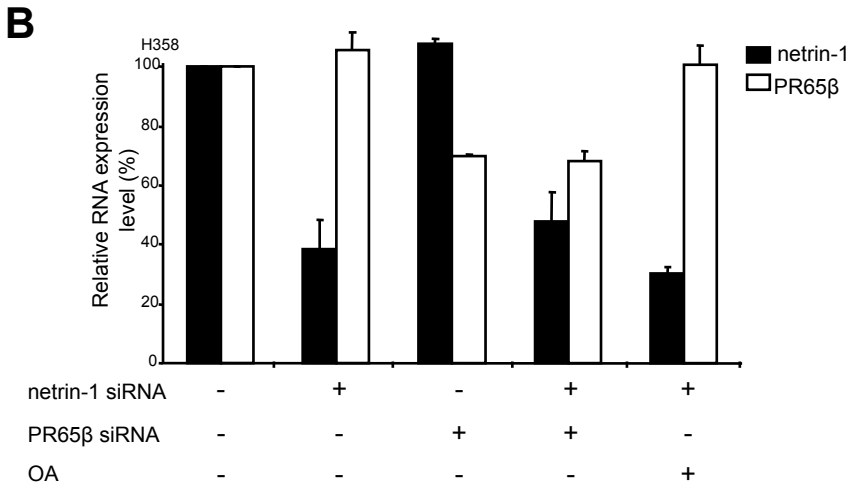

netrin-1
Lipid raft
Ser 308
DAPk
CIP2A
PP2Ac
ß
PR65ß
Cell survival
DAPk
activation
PP2Ac
ß
PR65ß
Apoptosis

Figure 8

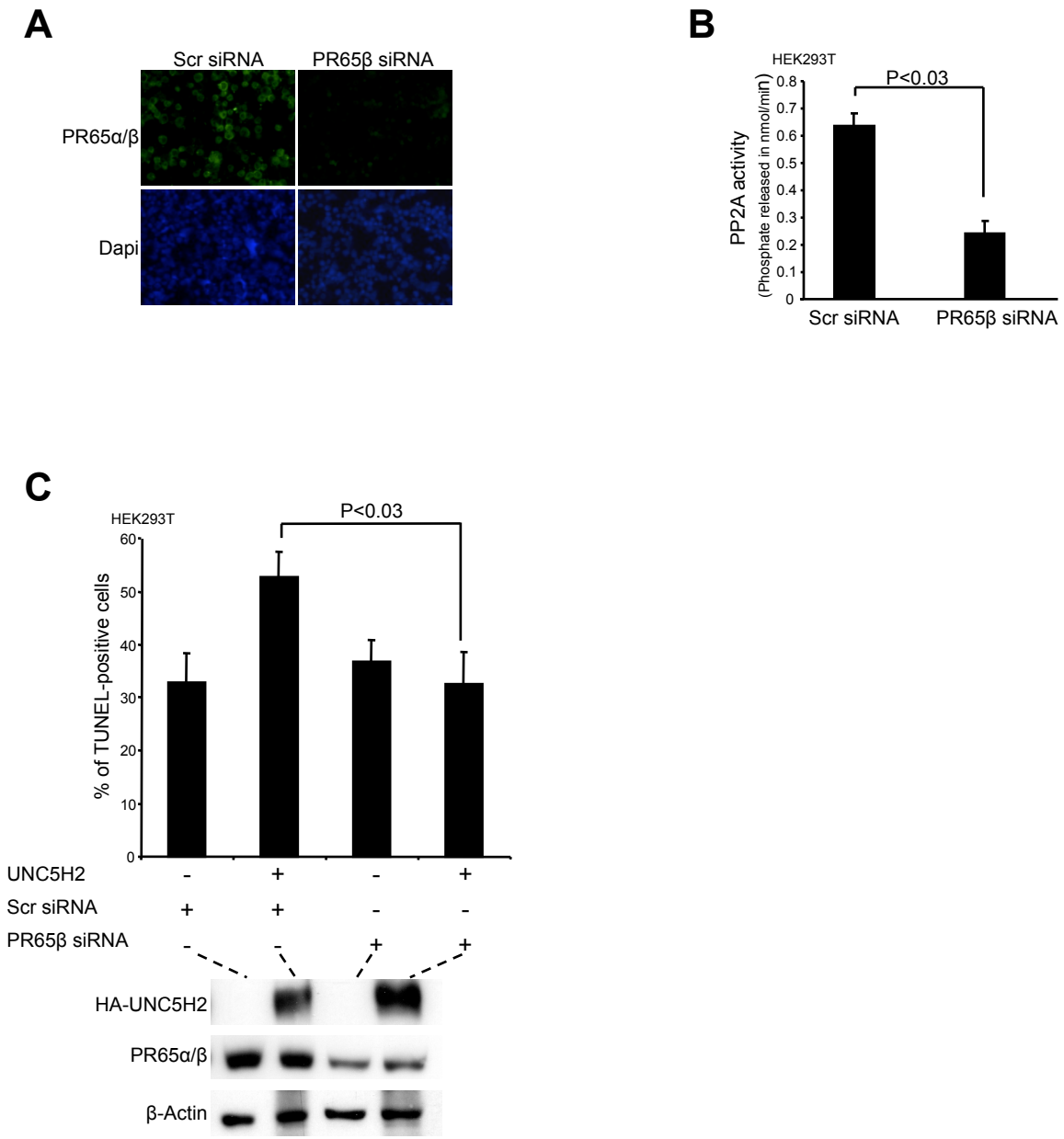
Lithostathine (REG1A)	serine/threonine kinase 24 (STE20 homolog)
protein tyrosine phosphatase, receptor type, S (PTPRS)	Blocked early in transport 1 homolog (BET1)
CD36 molecule (thrombospondin receptor) (CD36)	CHK1 checkpoint homolog (CHEK1)
sciellin (SCEL)	Thymosin beta 15a (TMSB15A)
protein phosphatase 1A (formerly 2C) magnesium dependent alpha isoform (PPM1A)	Cathepsin Z (CTSZ)
Protein phosphatase 2 (formerly 2A) subunit A (PR65), βisoform (PPP2RB1)	Casein Beta
Kinesine Family member 15 (KIF15)	Microtubule-actin crosslinking factor 1 (MACF1)
mature T cell proliferation 1, nuclear gene encoding mitochondrial protein (MTCP1)	testraspanin 32 (TSPAN32)
TRK-fused gene	Low density Lipoprotein Receptor
A kinase (PRKA) anchor protein 11 (AKAP11)	poly ADP ribode glycohydrolase (PARG)
BCL-6 (B-Cell Lymphoma)	S phase associated protein kinase 2 (SKP2)
LSM6 homolog (U6 small nuclear RNA associated Homolog)	EVH1 domain binding protein
MMP 26	mitogen activated protein kinase 6 (MAPK6)
Pyrophosphate (inorganic) 1 (PPA1)	complement component 6
MTRF1 (Mitochondrial translational release factor 1)	Translocase of Inner Mitochondrial member 13 homlog
Voltage gated channel shaker-related B member 3 (KCNAB3)	prostagladin-endoperoxide synthase 1
Tis11d (tristetraproline)	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 4 (GalNAc-T4)
G protein coupled receptor 1	EVOLV family member 5 (EVOLV5)
Pleiomorphic adenoma gene like-2 (PLAGL2)	Brain specific STE-20 like protein kinase 3 (STK3)
Sec23 homolog A	Golgi Vesicular membran trafficking protein p18
EGF like module containing mucin like hormon receptor-like 1 (EMR-1)	KH domain containing RNA binding signal transduction associated 1 (KHDRBS1)
Zinc finger protein 117 (KRAB family)	Zinc finger protein 124 (ZFP36L2)
Microfibrillar associated protein 5 (MPAP5)	Cyclin dependent kinase inhibitor 1B (p27, KIP1)
Fibrinogen A chaine beta	Karyopherin alpha 1 (importin alpha5)

Supplementary Table 1

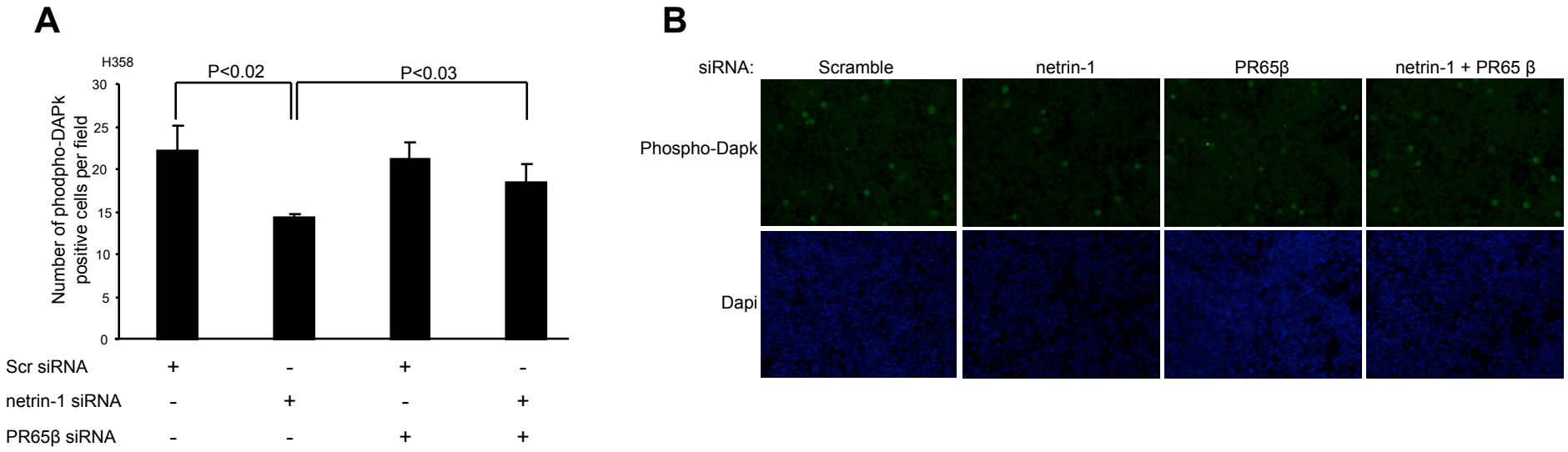




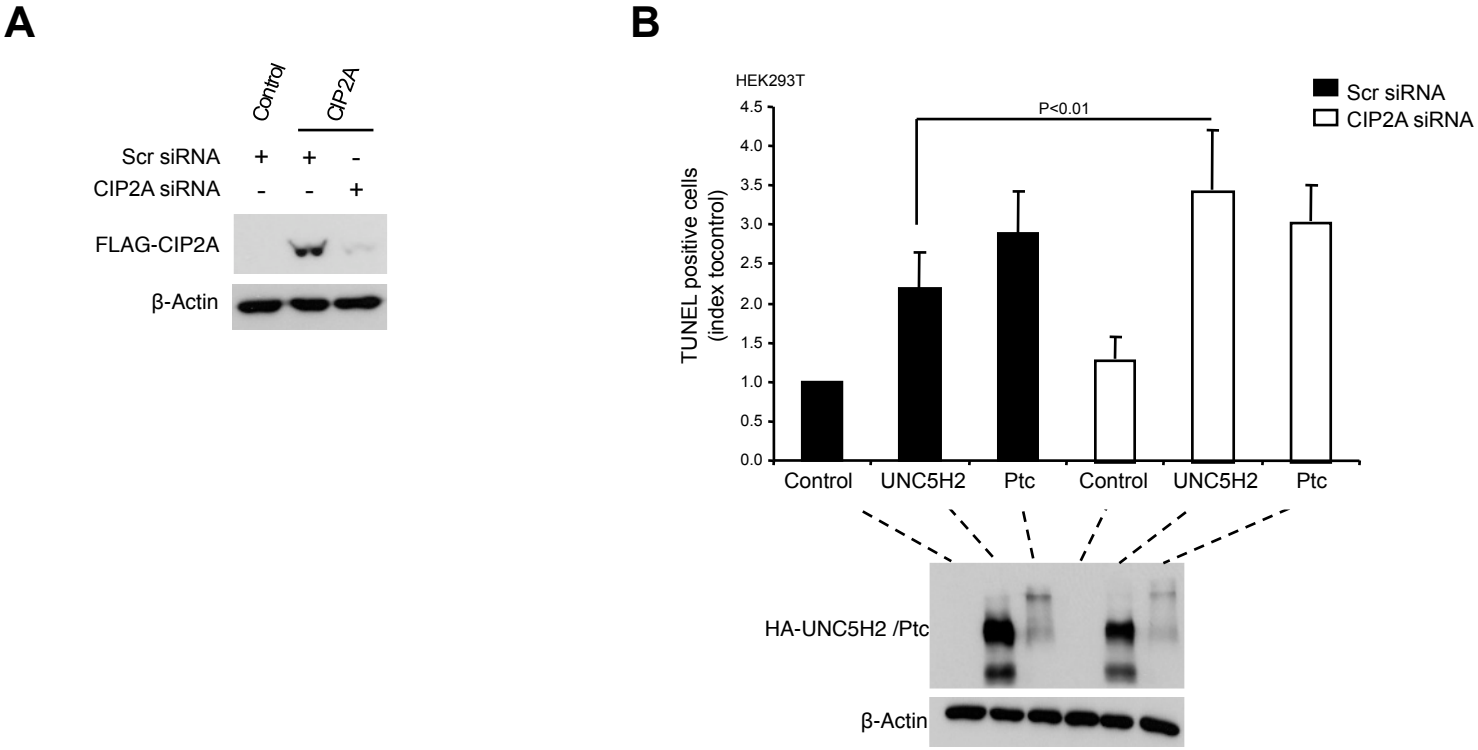
Supplementary Figure 1



Supplementary Figure 2



Supplementary Figure 3



Supplementary Figure 4

Discussion

Les récepteurs à dépendance constituent une nouvelle famille de récepteurs présentant une double signalisation : positive en présence de ligand -ces récepteurs confèrent à la cellule des signaux de migration, guidage, prolifération voir d'adhésion- ; et négative en absence de ligand –ils induisent la mort cellulaire par apoptose-. Ils ont été décrits pour avoir un rôle au cours du développement de certains organes, et leur expression demeurant chez l'adulte dans la plupart des tissus, ils ont été décrits comme des systèmes de sauvegarde, leur fonction apoptotique leur conférant un rôle suppresseur de tumeurs.

Nous nous sommes intéressés plus particulièrement aux récepteurs à dépendance UNC5H1-3 et DCC ayant pour ligand commun la Nétrine-1. Ces récepteurs initialement décrits pour être impliqués dans le guidage axonal et la migration neuronale au cours du développement ont plus récemment été décrits comme des suppresseurs de tumeurs dans le système digestif, leur perte de fonction pro-apoptotique étant associée à la tumorigenèse.

De part la fonction particulière des récepteurs à dépendance, la perte de leur fonction pro-apoptotique peut être liée à trois types de dérégulations différentes : (i) la perte d'expression ou de fonction du récepteur lui même, (ii) l'inactivation de la signalisation intracellulaire pro-apoptotique induite par les récepteurs ou bien encore (iii) l'expression en excès du ligand (pour revue voir **Annexe I** (Mehlen and Guenebeaud, 2009).

1. La perte d'expression ou l'inactivation des récepteurs UNC5H et DCC est associée à la tumorigenèse.

La perte d'expression du récepteur DCC (*Deleted in Colorectal Carcinoma*) a initialement été mise en évidence dans les cancers colorectaux puisque 70% des cancers colorectaux montrent une perte de ce récepteur par LOH. Malgré quelques controverses indiquant que d'autres gènes suppresseurs de tumeurs présents dans les régions chromosomiques soumises à ces LOH puissent être impliqués dans les phénomènes de tumorigenèse, la perte de DCC semble bien être un avantage sélectif acquis par les cellules tumorales puisque que l'expression de DCC est effectivement absente dans la plupart des cancers et des lignées cellulaires dérivées.

La perte d'expression des autres récepteurs à la Nétrine-1 a été plus récemment montrée dans les cancers colorectaux. En effet, plusieurs études menées au laboratoire montrent qu'une perte d'expression des récepteurs UNC5H et, en particulier, que la perte du récepteur UNC5H3 par hyperméthylation du promoteur est associée à la tumorigenèse colorectale (Bernet et al., 2007; Thiebault et al., 2003). De plus, des mutations inhibant la fonction apoptotique du récepteur UNC5H3 ont été retrouvées dans les formes familiales de

cancers colorectaux (Coissieux et al, en préparation). Par ailleurs, dans des modèles murins, il a été montré que la perte de fonction du récepteur UNC5H3 était un élément favorisant la progression tumorale (Bernet et al., 2007). Ainsi, la perte de la fonction apoptotique de ces récepteurs à la nétrine-1 pourrait constituer un avantage sélectif contribuant à l'échappement tumoral.

2. ***Perte de fonction des effecteurs de la signalisation apoptotique des récepteurs à la Nétrine-1.***

Actuellement, la signalisation pro-apoptotique des récepteurs à dépendance ayant pour ligand la Nétrine-1 est peu connue. En effet, seules les protéines NRAGE (*Neurotrophin Receptor p75 interaction MAGE homolog*) et la DAPk (*Death Associated Protein kinase*) ont été décrites respectivement comme des protéines effectrices de la signalisation pro-apoptotique des récepteurs UNC5H1 et UNC5H2 (Llambi et al., 2005; Williams et al., 2003a). Ces deux partenaires ont été mis en évidence de façon différente : l'identification de NRAGE a été réalisée grâce à un crible double-hybride utilisant le domaine intracellulaire des récepteurs UNC5H, et l'identification de la DAPk est issue de la recherche d'homologie entre le domaine de mort des récepteurs UNC5H avec d'autres protéines possédant un domaine de mort puisque ces domaines sont connus pour interagir de manière homotypique.

De manière intéressante, la perte de fonction de ces deux effecteurs est également associée à la tumorigenèse renforçant l'hypothèse selon laquelle la fonction apoptotique des récepteurs UNC5H est à l'origine d'une fonction de suppresseur de tumeur. Ainsi, il a été montré que l'expression de la DAPk était perdue dans plus de 60% des cancers colorectaux, ou bien encore des mélanomes (Hoon et al., 2004; Mittag et al., 2006; Pulling et al., 2009). De manière intéressante, il a été montré que la perte d'expression de la DAPk était également corrélée à la progression tumorale dans le colon. En effet, alors que 60% des néoplasies colorectales présentent une perte de la DAPk par méthylation de son promoteur, cette proportion passe à 81.2% dans les formes les plus avancées que sont les carcinomes colorectaux (Mittag et al., 2006). Ainsi, la perte de la DAPk pourrait constituer un élément important pour la progression tumorale. En outre, bien qu'il n'existe pour l'instant pas d'étude décrivant la perte de fonction de NRAGE dans les cancers, sa perte de fonction pourrait être associée à une augmentation de l'agressivité tumorale dans les mélanomes et les cancers pancréatiques de manière indirecte. En effet, il a été montré *in vitro* et *in vivo* sur des lignées tumorales dérivées de ces deux cancers que l'inhibition de NRAGE entraînait une

activation de la Métalloprotéase 2 (MMP-2) à l'origine d'un pouvoir invasif accru des cellules tumorales (Chu et al., 2007).

Afin d'identifier de nouveaux effecteurs pro-apoptotiques des voies de signalisation induites par les récepteurs UNC5H en absence de Nétrine-1, nous avons réalisé un crible d'ARN interférence (siARN) dans la lignée tumorale humaine mammaire Cal51 où les récepteurs UNC5H1, UNC5H2 et UNC5H3 sont exprimés contrairement au récepteur DCC. Les résultats obtenus sont présentés en **Annexe II**. Les protéines identifiées peuvent être groupées selon leurs fonctions. En effet on trouve des protéines kinases et phosphatases, des protéines effectrices de l'apoptose, des régulateurs de la transcription et de la traduction, des transporteurs intracellulaires ou bien encore des récepteurs transmembranaires. De manière surprenante, la DAPk ou bien encore la protéine NRAGE n'ont pas été identifiées alors qu'elles appartenaient bien à la liste des 8500 gènes ciblés par la banque lentivirale utilisée porteuse des siARN. Deux hypothèses peuvent permettre de répondre à cela : (i) d'une part la totalité des clones obtenus après le crible n'a pas encore été analysée ; (ii) d'autre part, il est possible que ces protéines aient également un rôle fondamental pour la survie cellulaire et que leur délétion ait conduit à la mort des clones en question.

Parmi les protéines identifiées et en fonction des données de la littérature, 8 protéines sont des protéines pro-apoptotiques, 7 sont décrites plutôt comme étant anti-apoptotiques et 2 semblent intervenir dans les deux processus ; les autres protéines n'ayant pas de rôle connu dans l'apoptose (**voir Annexe II**). La présence de protéines à fonction plutôt anti-apoptotique au sein du crible est surprenante. Toutefois, l'analyse des séquences siRNA obtenues après le crible révèle que certains siRNA ne sont pas vraiment spécifiques de leur gène cible. Par exemple le siRNA ciblant MTCP1 (*mature T cell proliferation 1*) présente 60% d'identités de séquence (résultat obtenu grâce à nBLAST) avec le gène codant PLAG2 (*Pleimorphic Adenoma Gene like 2*). L'ensemble des gènes potentiellement ciblés de part une forte homologie avec les siRNA (supérieure à 60%) comme PLAG2 par d'autres siRNA est indiqué en **annexe III**.

Cependant, le manque de spécificité de certains siRNA peut être compensé par le fait que dans la banque lentivirale utilisée chaque gène est ciblé par 3 siRNA de séquences différentes, permettant de retrouver plusieurs fois, avec plusieurs séquences, un gène qui s'avère être un bon candidat. Ainsi, les effecteurs PR65β, EMR1 (*EGF like module containing mucin like hormon receptor-like 1*) et PLAG2 (de part sa reconnaissance partielle par le siRNA MTCP1) ont été identifiés deux fois grâce à deux séquences siRNA différentes.

Nous nous sommes donc focalisés sur l'un de ces effecteurs retrouvés plusieurs fois, la protéine PR65β, une sous-unité associatrice du complexe PP2A et cela pour deux raisons : (i) cette sous-unité est impliquée dans l'apoptose et (ii) une étude récente avait montré que l'activité de la DAPk était effectivement modulée par une phosphatase dont la nature n'avait pas été identifiée (Gozuacik et al., 2008; Mumby, 2007).

Tout d'abord, nous avons vérifié que l'inhibition de PR65β était bien un élément suffisant à l'inhibition de la mort cellulaire induite par la privation de Nétrine-1 sur les cellules Cal51, puis, nous nous sommes employés à caractériser le rôle de PR65β dans la signalisation apoptotique médiée par UNC5H2 et la DAPk en absence de Nétrine-1.

Les résultats obtenus ont permis de montrer que PR65β, est indispensable à l'apoptose induite par le récepteur UNC5H2 via la déphosphorylation de la DAPk par le complexe PP2A. Par ailleurs, il a été montré au laboratoire que le récepteur UNC5H2 et la DAPk étaient capables d'interagir de manière constitutive et qu'en absence de Nétrine-1, ce complexe était transloqué dans les rafts, ce changement de localisation étant à l'origine de l'activation de la DAPk via sa déphosphorylation et de l'induction de l'apoptose sans qu'aucun mécanisme moléculaire sous jacent n'ait été identifié (Llambi et al., 2005; Maisse et al., 2008).

Nous avons montré que PR65β était recruté spécifiquement par le complexe DAPk/UNC5H2 en absence de Nétrine-1 et que ce recrutement était dépendant de la conformation du domaine intracellulaire du récepteur UNC5H2 (**figure 31**). En effet, il a été montré par l'équipe Zhang que le domaine intracellulaire du récepteur UNC5H2 était capable d'adopter en absence de Nétrine-1 une conformation non-apoptotique masquant le domaine de mort grâce à une structuration en « supramodule » inhibant ainsi l'apoptose induite par le récepteur UNC5H2 (Wang et al., 2009a), ceci pouvant être expliqué par un encombrement important empêchant le recrutement de PP2A (**figure 31A**). En absence de Nétrine-1, ce supramodule disparaîtrait, libérant le domaine apoptotique -cela tout en permettant la monomérisation du récepteur- et permettant aisément le recrutement d'autres protéines intracellulaires comme PP2A (**figure 31B**).

Par ailleurs, les données de la littérature nous ont permis de nous intéresser à la protéine CIP2A (*Cancerous Inhibitor of PP2A*) décrite pour avoir une fonction inhibitrice de PP2A (Junttila et al., 2007b). La protéine CIP2A a été caractérisée comme une protéine surexprimée dans de nombreuses lignées cellulaires cancéreuses et proposée comme un oncogène de part son rôle dans la stabilisation de c-Myc via l'inhibition de PP2A. Nous avons montré que la protéine CIP2A était à l'origine d'un second mécanisme participant au

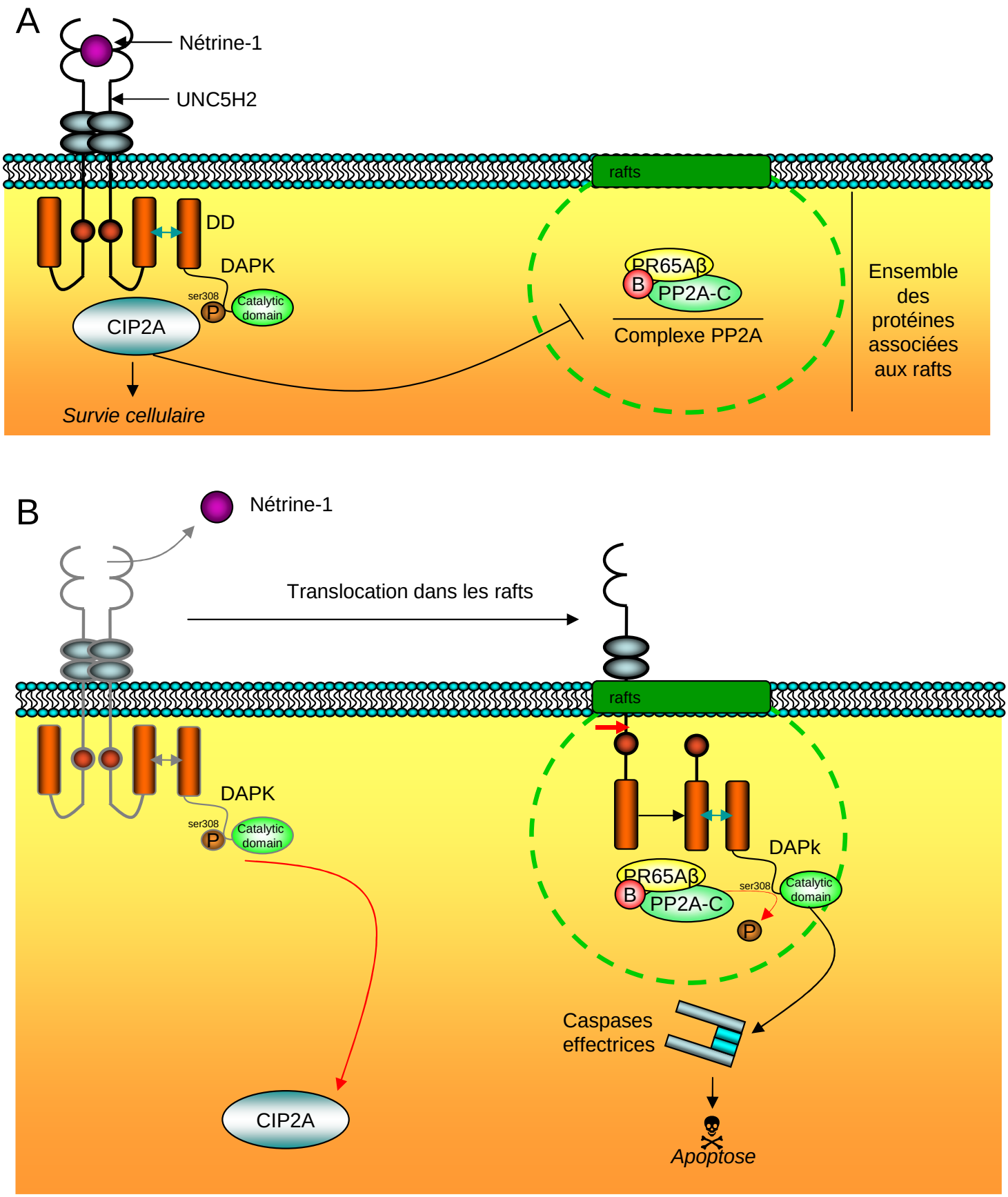


Figure 31 : Modèle d'implication du complexe PR65β/PP2A et de CIP2A dans la signalisation induite par le récepteur UNC5H2

A. De manière constitutive, les récepteurs UNC5H2 interagissent avec la DAPk et ce complexe est localisé, en présence de Nétrine-1, en dehors des radeaux lipidiques (rafts). De plus, CIP2A interagit avec ce complexe en présence de Nétrine-1 et maintiendrait la phosphorylation de la DAPk en inhibant PR65β/PP2A. **B.** En absence de Nétrine-1, le changement de conformation du domaine intracellulaire du récepteur UNC5H2, induirait un détachement de CIP2A, et une translocation du complexe UNC5H2/DAPk dans les rafts. A ce niveau, le complexe résidant PP2A composé d'une sous unité catalytique (C), d'une sous-unité régulatrice (B) et de la sous-unité associatrice PR65Aβ identifiée par le crible déphosphorylerait la DAPk, conduisant ainsi à son activation et à l'induction de l'apoptose.

maintien de l'autophosphorylation inhibitrice de la DAPk en présence de Nétrine-1. En effet, CIP2A est capable d'une part d'interagir avec le récepteur UNC5H2 en présence de Nétrine-1, et d'autre part d'inhiber l'apoptose induite par le récepteur UNC5H2 en absence de Nétrine-1 en participant au maintien de l'autophosphorylation de la DAPk (**figure 31**). La protéine CIP2A a été caractérisée comme une protéine surexprimée dans de nombreuses lignées cellulaires cancéreuses et proposée comme un oncogène de part son rôle sur la stabilisation de c-Myc via l'inhibition de PP2A. Une hypothèse pourrait être que CIP2A empêche la mort induite par UNC5H2 en agissant comme un régulateur de PP2A, faisant de cette protéine un autre élément du complexe, cible potentielle du processus tumoral.

Enfin, nous avons également montré que PR65β était indispensable à la fonction du récepteur UNC5H2 *in vivo*, en particulier dans la médiation du rôle pro-angiogénique de la Nétrine-1 dans la mise en place des vaisseaux intersegmentaires chez le zebrafish. En effet, des travaux menés au laboratoire et par d'autres groupes ont montré que la Nétrine-1 était un facteur pro-angiogénique, capable de stimuler la prolifération et la survie des cellules endothéliales en inhibant la voie de signalisation apoptotique médiée par le récepteur UNC5H2 et la DAPk *in vitro* et *in vivo* (Castets M., 2009; Navankasattusas et al., 2008; Nguyen and Cai, 2006; Yang et al., 2007b). Nous avons pu mettre en évidence que PR65β est un acteur indispensable à l'apoptose des cellules endothéliales induite par UNC5H2 lors du retrait de la Nétrine-1.

Etant donné l'importance du récepteur UNC5H2 dans différents processus du développement, nous nous sommes tout d'abord focalisés sur l'interaction PP2A/DAPk et ce récepteur. Cependant, rien n'exclu une interaction de PP2A/DAPk avec les récepteurs UNC5H1 et UNC5H3, les autres récepteurs à la Nétrine-1 comme DCC ou Néogénine, voir les autres récepteurs à dépendance. En effet, il a été montré que les récepteurs UNC5H1 et UNC5H3 étaient également capables d'interagir avec la DAPk (Llambi et al., 2005). Bien qu'aucune relation fonctionnelle n'ait pour l'instant été établie entre cette interaction et la signalisation apoptotique induite par les récepteurs UNC5H1 et UNC5H3, nous nous sommes demandés si PR65β était impliqué dans les voies de signalisation pro-apoptotiques induites par ces deux récepteurs. Nous avons pour cela utilisé deux modèles cellulaires (lignée pulmonaire H358 et lignée de neuroblastome IMR32) dans lesquels il a été montré que la privation de Nétrine-1 par siRNA entraînait spécifiquement l'activation conjointe des voies de signalisation apoptotiques médiées par les récepteurs UNC5H1 et UNC5H2 (lignée H358) ou UNC5H1 et UNC5H3 (lignée IMR32). Nous avons ainsi montré que le complexe

PR65β/PP2A est potentiellement impliqué dans la voie de signalisation apoptotique induite par les récepteurs UNC5H1 et UNC5H3 car l'inhibition de PR65β par siRNA ou l'inhibition de PP2A par l'acide okadaïque sont suffisants pour bloquer l'apoptose induite par la privation de Nétrine-1 dans ces deux lignées cellulaires (**figure 32A et B**). De plus, l'implication de PR65β/PP2A dans la voie de signalisation apoptotique du récepteur UNC5H1 a été confirmée puisque l'inhibition de PP2A par l'acide okadaïque est suffisante pour bloquer l'apoptose induite par la surexpression du récepteur UNC5H1 (transfection) dans des cellules HEK293T (**figure 32C**) et l'implication de PR65β dans cette mort cellulaire a également pu être mise en évidence (Guenebeaud et al, soumis). En revanche, l'implication du complexe PR65β/PP2A dans la voie de signalisation apoptotique du récepteur UNC5H3 reste à confirmer.

Par ailleurs, nous avons montré que l'inhibition de PP2A par l'acide okadaïque était également responsable de l'inhibition de l'apoptose induite par le récepteur DCC exprimé de manière transitoire dans des cellules HEK293T mais pas de l'apoptose induite par le récepteur à dépendance Patched (**figure 32**). Il semble donc que si la participation de PP2A n'est pas un phénomène commun à l'ensemble des récepteurs à dépendance, il peut être présent dans la signalisation des récepteurs à dépendance fixant la Nétrine-1. Cependant, il a été clairement montré que DCC n'interagissait pas avec la DAPk (contrairement à son homologue Néogénine, un autre récepteur à dépendance)(Fujita et al., 2008), suggérant qu'il existe deux mécanismes pro-apoptotiques différents mais non-exclusifs impliquant PP2A dans l'apoptose : un mécanisme DAPk-dépendant (**figure 33**) ou un mécanisme DAPk indépendant (**figure 34**), chacun pouvant potentiellement passer par des voies sous-jacentes encore différentes rejoignant éventuellement les voies classiques d'apoptose intrinsèque et extrinsèque (Guenebeaud et al, soumis).

En effet, il est intéressant de noter qu'une activité « PP2A-like » a été décrite pour être impliquée dans la modulation de l'apoptose en régulant la formation du DISC (voie extrinsèque) et la voie intrinsèque en particulier via la modulation de l'activité de Bcl-2 et Bax (voie intrinsèque) ainsi que dans la modulation de la déphosphorylation de la DAPk dans le stress induit par le réticulum endoplasmique, PP2A n'ayant pu être catégoriquement identifiée dans ces études de part l'utilisation d'inhibiteurs peu spécifiques des phosphatases (Chatfield and Eastman, 2004; Gozuacik et al., 2008). Plus spécifiquement PP2A/PR65β a été impliqué dans 3 trois mécanismes majeurs en lien avec la régulation des voies classiques de l'apoptose : (i) l'inhibition du facteur de transcription NFκB, (ii) l'inhibition de la protéine kinase Akt, (iii) et potentiellement avec l'inhibition de la rhoGTPase RalA (**figure 34**)(cf Chap 1, IV D.2 p21). En effet, dans ce dernier cas, l'activité de la RhoGTPase RalA a été

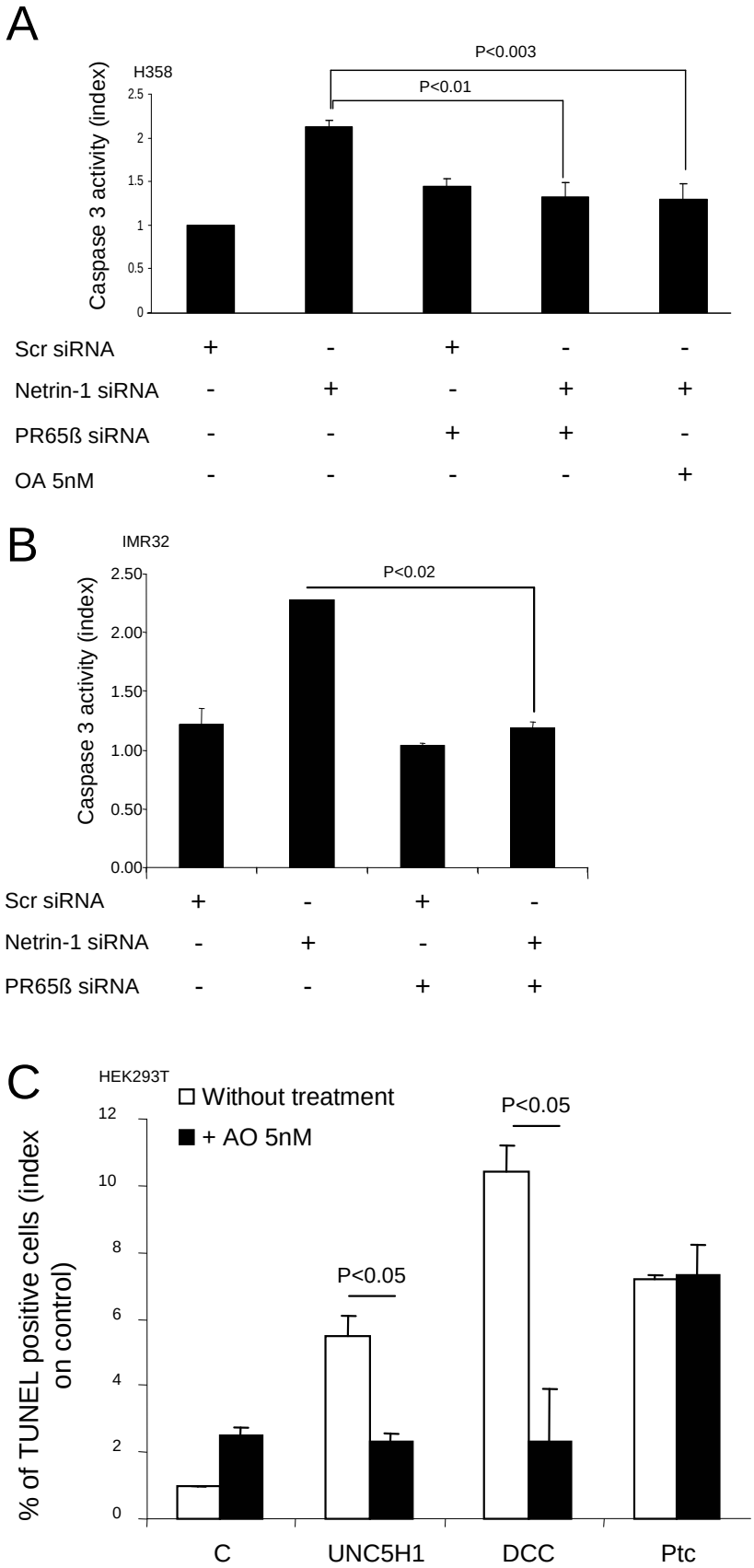


Figure 32 : le complexe PP2A/PR65β est important à l'induction de l'apoptose induite par UNC5H1, UNC5H3 et DCC.

A-C l'inhibition de PP2A par l'acide okadaïque ou plus spécifiquement par le siRNA PR65β est suffisante à inhiber l'apoptose induite par les récepteurs à dépendance UNC5H1, UNC5H2, UNC5H3 et DCC. **A-B**. La quantification de l'activité caspase 3 dans des cellules H358 (VS IMR32) où seules les voies de signalisation apoptotique médiées par UNC5H1 et UNC5H2 (VS UNC5H1 et UNC5H3) sont fonctionnelles montre que l'inhibition de PR65β par siRNA ou de l'activité phosphatase par l'acide okadaïque est suffisante à inhiber l'apoptose induite par la privation de Nétrine-1 par siRNA. **C.** Quantification d'un marquage TUNEL révélant que l'apoptose induite par la surexpression du récepteur UNC5H1 et DCC est spécifiquement réduite par l'inhibition des phosphatases par l'acide okadaïque. Les valeurs P indiquées ont été calculé par U-test (test statistique Mann Whitney).

associée à la survie et à la transformation tumorale mais à l'inverse, il n'existe pas d'évidence directe que l'inhibition de RalA conduit à l'apoptose.

Jusqu'à présent, les voies apoptotiques induites par les récepteurs à dépendance étaient considérées comme à part, par rapport à la signalisation des récepteurs de mort, notamment à cause du fait que la signalisation apoptotique du premier récepteur à dépendance caractérisé, DCC, implique la caspase 9 mais n'implique pas l'un des complexes pro-apoptotique majeur : l'apoptosome (Mehlen et al., 1998). Notre étude révèle pour la première fois grâce à la mise en évidence de PP2A, qu'il existe une connexion entre la voie de signalisation apoptotique du récepteur UNC5H2 et les voies d'apoptose « classiques » (**figure 33 et 34**), les résultats impliquant PP2A/PR65β dans la signalisation apoptotique des récepteurs UNC5H1, UNC5H3 et DCC (**figure 32**) suggérant que l'ensemble des voies de signalisation des récepteurs à dépendance ayant pour ligand la Nétrine-1 puisse également présenter cette connexion (**figure 34**).

Il est intéressant de constater que la perte de fonction du partenaire trouvé lors du crible, PR65β, et du complexe PP2A, a été observée dans de nombreux cancers tels que les cancers du sein, les cancers de l'ovaire et les cancers thyroïdiens (Chou et al., 2007; Esplin et al., 2006; Hemmer et al., 2002; Tamaki et al., 2004; Wang et al., 1998; Yeh et al., 2007). Deux types de perte de fonctions principales ont été identifiés dans ces cancers : (i) d'une part des mutations ponctuelles qui sont dans certains cas à l'origine d'une dissociation de PR65β et de la sous-unité catalytique du complexe PP2A, et (ii) d'autre part une surexpression de la protéine inhibitrice de PP2A via sa fixation sur PR65 : CIP2A (Junttila et al., 2007b; Junttila and Westermarck, 2008; Sablina et al., 2007). Ainsi, nous avons mis en évidence deux nouveaux effecteurs, PR65β et CIP2A, impliqués dans la voie de signalisation apoptotique du récepteur UNC5H2 et potentiellement impliqués dans la voie de signalisation des autres récepteurs à dépendance à la Nétrine-1, et dont la perte de fonction (PR65β) ou le gain de fonction (CIP2A), pourraient entraîner une inhibition de l'apoptose induite par les récepteurs UNC5H et DCC. Ainsi, PR65β et CIP2A sont potentiellement deux nouvelles protéines impliquées dans l'activité suppresseur de tumeur des récepteurs UNC5H et DCC.

De manière intéressante, le crible a permis d'identifier d'autres protéines ayant une relation déjà décrite avec les récepteurs UNC5H (**figure 35**) : des protéines modulatrices de la voie p53 (facteur de transcription régulé par UNC5H2), des protéines modulatrices de la voie positive induite par les récepteurs à dépendance, des protéines impliquées dans la synthèse des radeaux lipidiques, des cibles de PP2A et des récepteurs transmembranaires impliqués

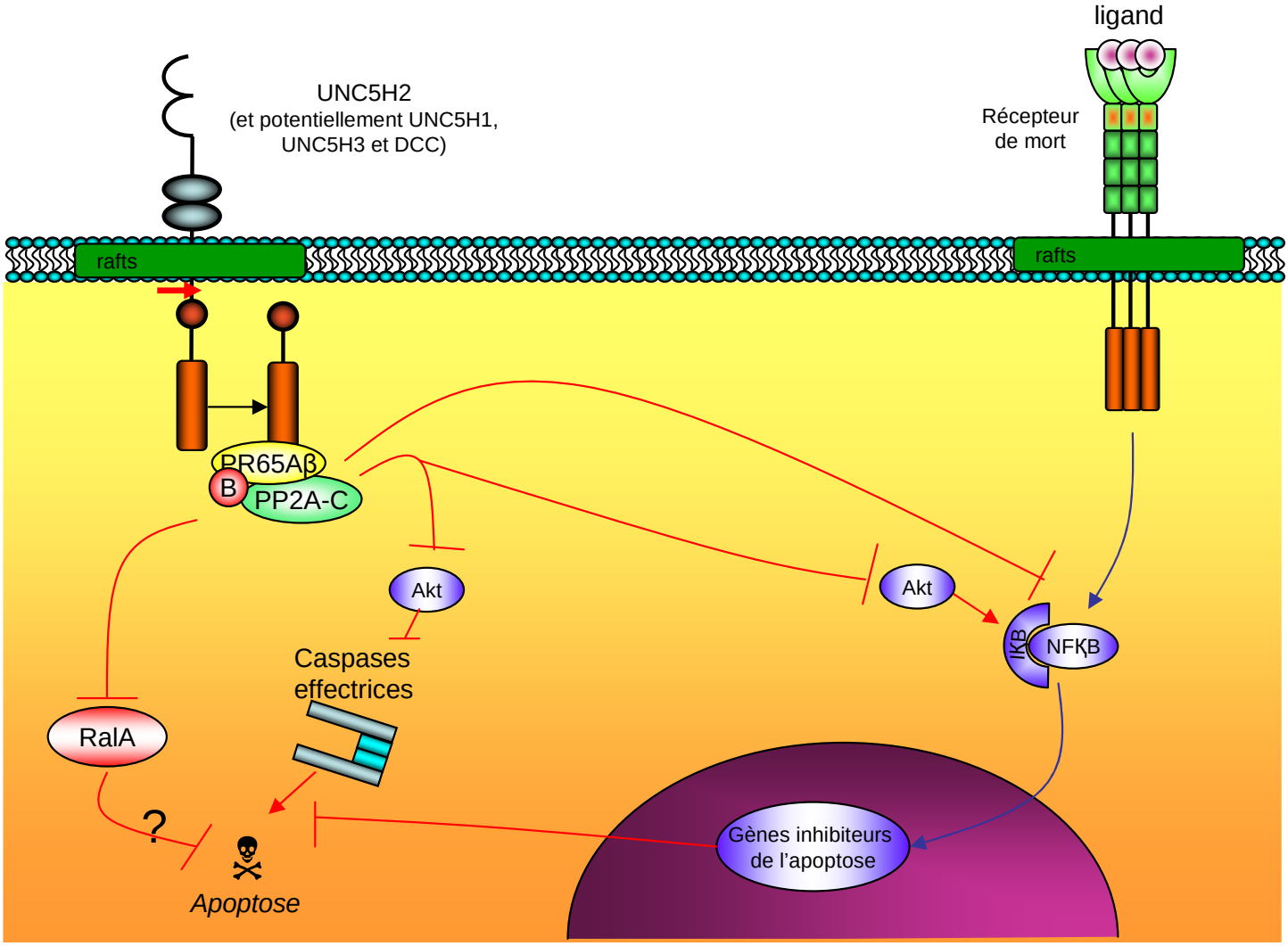


Figure 34 : Modèle de l'apoptose DAPk indépendante induite par les récepteurs à dépendance à Nétrine-1 (UNC5H et DCC)

En absence de Nétrine-1, les récepteurs seraient capables de s'associer avec PR65β/PP2A et d'induire l'apoptose via un phénomène DAPk indépendant passant par l'inhibition de deux protéines régulatrices communes à la voie des récepteurs de mort : Akt et NFKB, ici représentées en bleu. Un troisième mécanisme d'induction de l'apoptose induite par le complexe PR65β/PP2A est lié à l'inhibition de la rhoGTPase RalA mais le mécanisme par lequel cette protéine inhibe l'apoptose n'est pas connu.

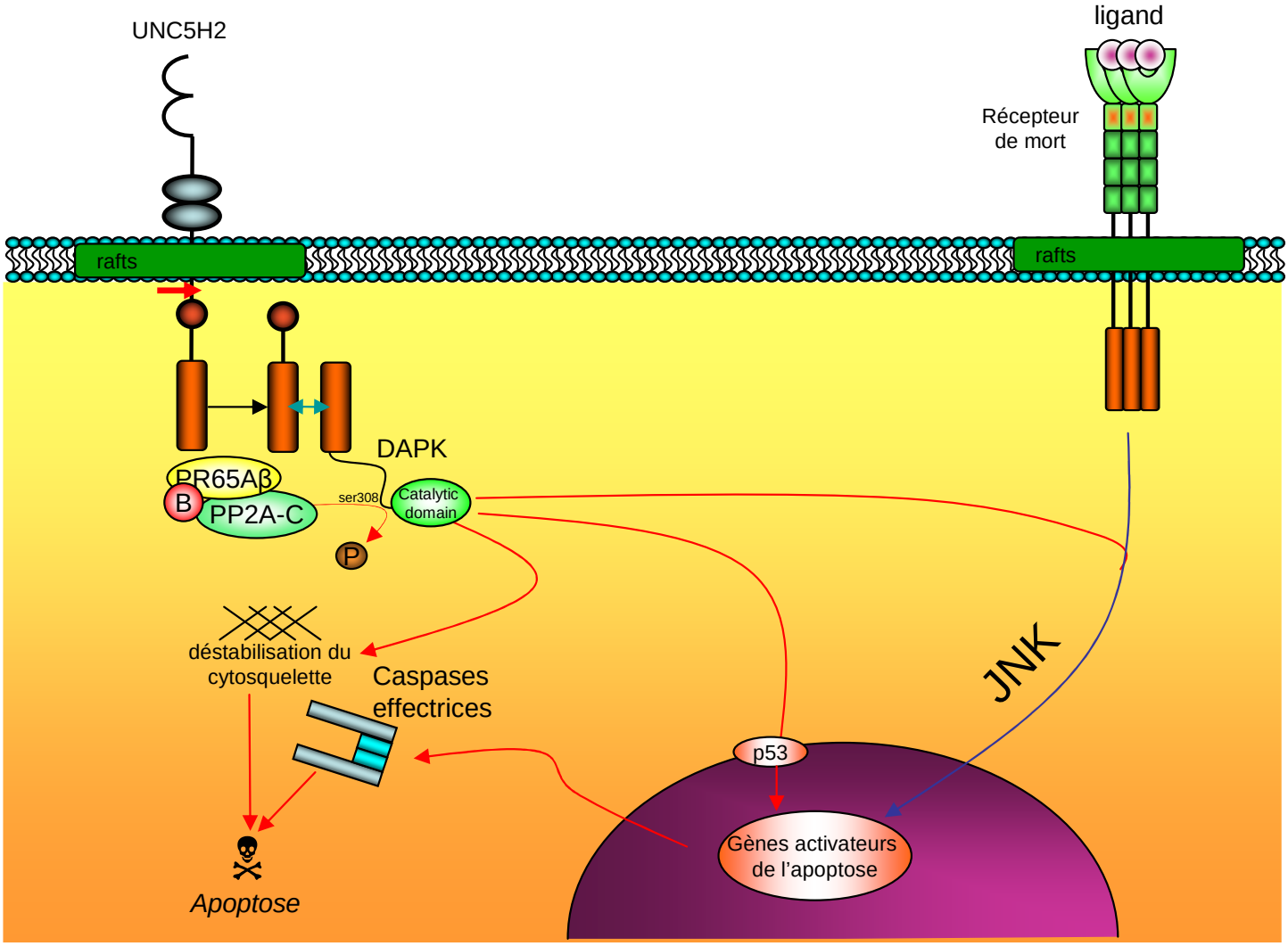


Figure 33 : Modèle de l'apoptose DAPk dépendante induite par UNC5H2

En absence de Nétrine-1, le récepteur UNC5H2 forme un complexe avec la DAPk et PR65β/PP2A qui permet la déphosphorylation et l'activation de la DAPk et l'induction de l'apoptose de manière DAPk dépendante. En effet, une fois activée la DAPk induit les voies JNK et p53 conduisant ainsi à la transcription de gènes activateurs de l'apoptose. La DAPk via son activité kinase serait également capable d'induire une déstabilisation du cytosquelette qui contribuerait également à l'apoptose. Sur ce schéma, la connexion entre la voie apoptotique UNC5H2 et la voie des récepteurs de mort via la voie JNK a été mise en évidence par une flèche bleue.

Partenaires identifiés	fonction	Voie ou fonction associée potentielle
Tis11d	facteur de transcription	Voie p53 (régulation transcriptionnelle d'UNC5H2)
PLAGL2	facteur de transcription	
MTCP1	régulateur d'Akt	voie positive
Trk-fused gene	régulateur de c-Src et NFKB	
COX1	régulateur d'Akt	
Akap11	régulateur de la PKA	
FYB	régulateur de Fyn	
STE-20	protéine kinase	Cibles de PP2A
STK3	protéine kinase	
ELOVL5	synthèse des sphingolipide	Formation des rafts
CD36	récepteur transmembranaire	Co-récepteurs de la Nétrine-1 associé aux récepteurs UNC5H
Neogenin 1 homolog	récepteur transmembranaire	

Figure 35 : Tableau récapitulatif des partenaires identifiés potentiellement impliqués dans la régulation de la signalisation induite par les récepteurs UNC5H.

Liste des partenaires potentiellement impliqués dans la signalisation des récepteurs UNC5H.

dans l'angiogenèse (CD36) et un autre récepteur à la Nétrine-1 (Néogénine) (**figure 35**). Dans le cas de Néogénine, il est toutefois à noter que cette identification demande confirmation car elle a été réalisée de manière indirecte, le siRNA normalement dirigé contre MMP-26 présentant 75% d'identités de séquence avec le gène *néogénine*).

Ainsi, ce premier crible d'ARN interférence réalisé au laboratoire a permis d'identifier de nombreux nouveaux effecteurs potentiels des voies de signalisation induites par les récepteurs UNC5H et en particulier d'identifier la sous-unité PR65β comme un effecteur essentiel de la signalisation induite par le récepteur UNC5H2. De nombreuses pistes ouvertes par le crible restent encore à explorer et permettront sans doute de caractériser d'autres effecteurs potentiels de la signalisation des récepteurs UNC5H. D'autres cribles basés sur le même principe seront réalisés au laboratoire dans les mois à venir notamment afin de caractériser la voie de signalisation apoptotique induite par le récepteur DCC. En effet, le crible siRNA sera également réalisé sur les cellules tumorales lymphoblastiques Granta exprimant la Nétrine-1 et seulement le récepteur DCC.

3. Perte de fonction apoptotique par gain de ligand : la surexpression de Nétrine-1

Surexpression du ligand et agressivité tumorale

Un troisième mécanisme peut également conduire à la perte de la fonction apoptotique des récepteurs à dépendance UNC5H et DCC : la surexpression de la Nétrine-1. Une première étude menée au laboratoire révèle que contrairement à la perte de fonction du récepteur UNC5H3 dans le colon, la surexpression de la Nétrine-1 dans l'épithélium intestinal est un évènement suffisant pour l'initiation des premières étapes de la tumorigenèse dans l'intestin (Mazelin et al., 2004). En effet, la surexpression de la Nétrine-1 dans l'intestin induit la formation d'hyperplasies épithéliales considérées comme des lésions pré-tumorales. Il faut cependant croiser ces souris avec des souris prédisposées au cancer du colon (mutation du suppresseur de tumeur APC) pour obtenir une progression tumorale allant jusqu'au stade avancé d'adénocarcinome indiquant que la surexpression de la Nétrine-1 a un rôle dans l'initiation et aussi dans la progression tumorale, contrairement à la perte de fonction d'UNC5H3 qui, seule, n'a pas d'effet et à besoin d'un évènement d'initiation (mutation du suppresseur de tumeur APC) pour déclencher la progression tumorale (Bernet et al., 2007; Mazelin et al., 2004). Cette différence d'agressivité tumorale bien que faisant intervenir la perte de fonction apoptotique du récepteur UNC5H3 dans les deux cas pourrait s'expliquer par la présence des autres récepteurs à dépendance à la Nétrine-1 dans l'intestin (UNC5H1, UNC5H2 et DCC). En effet, ces différents récepteurs pourraient contribuer de manière

redondante à induire l'apoptose des cellules épithéliales en absence de Nétrine-1 en cas de déficience du récepteur UNC5H3. A l'inverse, la surexpression de la Nétrine-1 ne permet de conserver la fonction apoptotique d'aucun autre récepteur à Nétrine-1 anéantissant ainsi tous les systèmes de sauvegarde cellulaire que représentent les récepteurs à dépendance à Nétrine-1. Il peut en être de même pour la mutation d'un effecteur commun des voies de signalisation des récepteurs à Nétrine-1. En effet, on peut imaginer que la perte d'expression du la sous-unité PR65β ait le même effet que la surexpression de la Nétrine-1, abolissant simultanément les signaux de mort des récepteurs UNC5H et DCC (Guenebeaud C. et al, soumis). Dans ce sens, il a été montré que la perte d'expression de la DAPk (par méthylation du promoteur) est associée à la transformation d'hyperplasies en carcinomes dans le colon (Mittag et al., 2006).

Les travaux réalisés au cours de ma thèse se sont intéressés à d'autres cancers que celui du colon et nous avons montré qu'une surexpression de la Nétrine-1 était associée à la tumorigenèse mammaire et pulmonaire et que la Nétrine-1 jouait le rôle de facteur de survie sur des lignées tumorales dérivées de ces cancers (cancers mammaires et pulmonaires) ainsi que sur des tumeurs fraîches humaines (cancer mammaire) présentant cette surexpression. D'autres études menées au laboratoire et par d'autres groupes ont montré que la surexpression de la Nétrine-1 était également associée à la tumorigenèse pancréatique, aux leucémies (de type LAM), aux mélanomes ou bien encore aux neuroblastomes, pouvant ainsi constituer un avantage sélectif pour la croissance tumorale de ces tissus.

L'analyse plus approfondie de l'ensemble de ces cancers a permis de montrer que la surexpression de la Nétrine-1 était corrélée à des stades cancéreux particulièrement agressifs tels que les cancers mammaires métastatiques, les neuroblastomes métastatiques de stade IV, les adénocarcinomes pancréatiques avec invasion ganglionnaire et les mélanomes métastatiques (Delloye-Bourgeois et al., 2009a; Delloye-Bourgeois et al., 2009b; Fitamant et al., 2008; Kaufmann et al., 2009; Link et al., 2007), indiquant encore une fois que la perte de fonction pro-apoptotique de l'ensemble des récepteurs à la Nétrine-1 conduirait à des stades avancés de la tumorigenèse. Comme expliqué précédemment, ce phénomène agressif peut-être lié à une inhibition de la fonction apoptotique de sauvegarde de l'ensemble des récepteurs UNC5H (DCC étant perdu dans ces cancers). Toutefois, étant donné le caractère métastatique retrouvé associé aux cancers du sein, on peut penser également que cette surexpression de Nétrine-1 permette d'associer à la perte d'apoptose, un gain de fonction des récepteurs dont la voie de signalisation positive serait constitutivement activée en présence de Nétrine-1. En effet, dans les tissus à l'origine de ces cancers, la Nétrine-1 est physiologiquement impliquée dans les processus de migration (pancréas, système nerveux) et

d'adhésion cellulaire (sein, peau). Ainsi, une hypothèse est que la surexpression de la Nétrine-1 dans ces tissus soit à l'origine d'une perte de l'adhésion cellulaire et d'une stimulation de la migration cellulaire qui constitueraient un autre avantage sélectif offert par la surexpression de la Nétrine-1 pour la dissémination des cellules tumorales dans les tissus adjacents ou vers les sites tumoraux secondaires (métastases). De plus, il a été montré au laboratoire que l'expression forcée de la Nétrine-1 dans des lignées tumorales nétrine-1 négatives (lignée mammaire murine 67NR et lignée pulmonaire humaine H460) entraînait une modification phénotypique caractérisée par un allongement de ces cellules soulignant le fait que la surexpression de Nétrine-1 pourrait être associée à une modification du comportement tumoral. Il est à noter cependant que l'expression forcée de Nétrine-1 dans ces cellules ne suffit pas à leur conférer un caractère métastatique *in vivo* (donnée non-publiée), l'expression de Nétrine-1 n'étant donc pas un évènement suffisant pour déclencher à elle seule le processus métastatique dans ces lignées tumorales.

Enfin, la Nétrine-1 étant également un facteur pro-angiogénique, nous pouvons également nous demander si l'agressivité observée des tumeurs surexprimant la Nétrine-1 n'est pas également due à la vascularisation de celles-ci. En effet, on peut aisément imaginer que la Nétrine-1 produite par les cellules tumorales soit capable de stimuler les cellules endothéliales de manière paracrine et ainsi contribuer à la progression tumorale. L'analyse des données cliniques des patientes atteintes d'un cancer du sein n'a, pour l'instant, révélé aucune corrélation entre un fort taux d'expression de la Nétrine-1 et la vascularisation tumorale (Guenebeaud et al, en préparation). Il est possible que cette absence de corrélation soit liée à un échantillonnage trop faible mais aussi au fait que seule une analyse macroscopique des tumeurs a été réalisée. Ainsi, une analyse plus approfondie est à faire afin d'analyser le rôle potentiel de la Nétrine-1 sur la microvascularisation tumorale. Il est à noter que lors de la réalisation de xénogreffes des lignées tumorales pulmonaires H358 exprimant fortement la Nétrine-1 (et les récepteurs UNC5H uniquement), nous avons pu observer le développement de vaisseaux sanguins intra-tumoraux, le développement de ces vaisseaux n'ayant pas été observé dans des tumeurs traitées avec le DCC-5Fbn, peptide inhibiteur de la Nétrine-1. La Nétrine-1 pourrait donc faciliter le développement tumoral en stimulant conjointement l'angiogenèse et la survie cellulaire.

Pour étudier la part de l'angiogenèse et de la perte d'apoptose dans le gain de Nétrine-1 des cellules tumorales, une étude utilisant des xénogreffes de cellules H358 invalidées pour les voies de signalisation UNC5H (cellules exprimant de manière stable le mutant dominant

négatif des récepteurs UNC5H) est en cours au laboratoire. Ces cellules H358 seront greffées à des souris *nude* et l'effet du peptide DCC-5Fbn sur la croissance tumorale sera analysé. Si malgré l'inhibition des voies de signalisation pro-apoptotiques des récepteurs UNC5H, une inhibition de la croissance tumorale des cellules H358 par le peptide est toujours observée, nous pourrons en conclure qu'une part de la croissance tumorale est liée à une stimulation de l'angiogenèse par les cellules tumorales surexprimant la Nétrine-1.

Nos travaux suggèrent pour la première fois que la surexpression de la Nétrine-1 est corrélée à une migration accrue des cellules tumorales conduisant non seulement à la dissémination métastatique mais aussi à l'invasion ganglionnaire dans le cancer du sein. Cela a ensuite été confirmé dans les neuroblastomes de stade IV ainsi que dans les adénocarcinomes pancréatiques car ces deux cancers présentent respectivement une dissémination métastatique et une invasion ganglionnaire. De plus, il semble qu'il existe une localisation préférentielle des métastases dans les organes où la Nétrine-1 est produite en condition physiologique (poumon, os et cerveau), permettant ainsi certainement de faire perdurer l'effet anti-apoptotique de la Nétrine-1 sur les cellules tumorales. Une autre question soulevée par cette dissémination métastatique est le moyen par lequel les cellules tumorales parviennent à survivre au cours de leur transit entre le site de la tumeur primaire et le site métastatique secondaire. Cela peut s'expliquer par deux processus non-exclusifs : (i) soit les cellules métastatiques ont la capacité de produire la Nétrine-1 de manière autocrine (phénomène que nous avons mis en évidence *in vitro* pour les lignées tumorales mammaires et pulmonaires)(Delloye-Bourgeois et al., 2009b; Fitamant et al., 2008), (ii) soit la production de Nétrine-1 par la tumeur induit la présence de Nétrine-1 dans le sang et le système lymphatique à un taux suffisant pour permettre la survie et la migration des cellules tumorales. Nous avons d'ailleurs pu montrer que la Nétrine-1 était détectable dans le sang et ce à un taux plus élevé chez les patientes atteintes d'un cancer du sein par rapport à des individus contrôles (Guenebeaud et al, en préparation).

Si il semble évident de part l'ensemble des résultats obtenus, que la production autocrine de Nétrine-1 par les lignées cellulaires utilisées soit importante pour l'agressivité tumorale, il n'est pas évident qu'au sein de la tumeur, la Nétrine-1 soit produite de façon précise. En effet, même si les immunomarquages révèlent que la Nétrine-1 est présente dans l'ensemble du tissu tumoral dans le sein et dans le poumon, cela ne signifie pas qu'elle est produite par les cellules tumorales elles-mêmes, puisqu'il s'agît d'un facteur diffusible. Ainsi,

en condition tumorale la Nétrine-1 pourrait stimuler la survie des cellules tumorales en étant produite de manière paracrine, (i) par une sous-population tumorale particulière, ou bien (ii) par des cellules non-tumorales adjacentes à la tumeur telles que les cellules mésenchymateuses. Dans les tumeurs pulmonaires non-à petites cellules, il semble que la production de la Nétrine-1 soit restreinte à une sous-population tumorale épithéliale comme le révèlent les hybridations *in situ* réalisées sur des coupes de tissu tumoral, cellules qui pourraient être des cellules peu différenciées correspondant peut-être à des cellules souches tumorales (Delloye-Bourgeois et al., 2009a). Un travail important pourrait être effectué afin de déterminer le type cellulaire réellement producteur de la Nétrine-1 et peut-être permettre de mettre en évidence la production de Nétrine-1 dans les cellules peu différenciées de type cellules souches et progéniteurs, la Nétrine-1 étant une protéine très exprimée surtout au cours du développement.

Mécanisme moléculaire de surexpression de la Nétrine-1

Un dernier point intéressant est le mécanisme moléculaire par lequel la Nétrine-1 est surexprimée dans les tumeurs. Il semble que la surexpression de Nétrine-1 ne soit pas liée à une amplification génique -caractéristique des oncogènes comme c-Myc- car aucune amplification de la région chromosomique 17p porteuse du gène *nétrine-1* n'a pu être observée dans les neuroblastomes qui montrent une surexpression de Nétrine-1 (Delloye-Bourgeois et al., 2009b). Afin de déterminer si cette surexpression était liée à une hyperactivation transcriptionnelle du gène de la *nétrine-1*, un vecteur porteur du promoteur de la *nétrine-1* fusionné au gène rapporteur de la luciférase a été transfecté dans des cellules tumorales surexprimant la Nétrine-1. Via la quantification de l'activité luciférase, cette expérience a mis en évidence une activation du promoteur de la Nétrine-1 uniquement dans les cellules tumorales exprimant fortement la Nétrine-1 en comparaison avec des cellules n'exprimant pas la Nétrine-1, suggérant que la surexpression de la Nétrine-1 observée dans les cancers est liée à une activation transcriptionnelle du gène de la *nétrine-1* (Paradisi et al., 2008). Par ailleurs, des études effectuées au laboratoire ont mis en évidence la présence de sites de fixation du facteur de transcription NFκB qui ont été identifiés dans la région promotrice de la Nétrine-1, et leur mutation inhibe l'activation transcriptionnelle de la Nétrine-1. Il a été montré que le facteur de transcription NFκB était fréquemment activé dans les cancers (cf **Figure 9**), cette activation étant également associée aux processus inflammatoires.

Ainsi, il semble que la surexpression de la Nétrine-1 dans les cellules tumorales soit bien la conséquence de l'activation du facteur de transcription NFκB et qu'une corrélation existe entre inflammation, cancer et production de Nétrine-1. En effet, une pathologie inflammatoire pourrait favoriser une transformation tumorale du tissu considéré par une surproduction de Nétrine-1 NFκB-dépendante et cela a déjà été montré au laboratoire dans un modèle murin d'étude de la maladie de Crohn (inflammation colorectale chronique)(Paradisi et al., 2008; Paradisi et al., 2009). D'autre part, il a été montré que la pancréatite chronique était associée à une activation de NFκB ainsi qu'à une prédisposition au développement de tumeurs pancréatiques (Lowenfels et al., 1993) suggérant également que dans cet organe une surproduction de Nétrine-1 liée à l'inflammation pourrait être un facteur prédisposant à la tumorigenèse.

Surexpression de Nétrine-1 : modèle intégré

En résumé, les études menées au laboratoire et par d'autres groupes ont permis de montrer que la surexpression de la Nétrine-1 constituait un avantage sélectif pour la croissance tumorale de part son rôle de facteur de survie et potentiellement via un rôle dans la perte de l'adhésion cellulaire, la stimulation de la migration cellulaire et la stimulation de l'angiogenèse. Nous avons également montré que la Nétrine-1 est un marqueur d'agressivité tumoral puisqu'elle favorise en particulier l'invasion des tissus adjacents de la tumeur et la dissémination métastatique. De manière remarquable, la plupart des cancers associés à une surexpression de Nétrine-1 affectent les couches épithéliales des organes branchés (poumon, glande mammaire, pancréas, colon). De manière générale, les épithélia se renouvellent en permanence à partir de cellules souches présentent à proximité des lames basales, qui se différencient en se divisant et finissent par mourir par apoptose. Ainsi la Nétrine-1 pourrait être associée à un modèle de régulation de cette homéostasie et du contrôle de la tumorigenèse généralisable aux organes branchés qui sont tous constitués d'un système de « branches » et de lobules dans lesquels le phénomène apoptotique est indispensable (**figure 36**). Selon ce modèle la Nétrine-1 diffusible présente dans l'environnement des cellules souches épithéliales contrôlerait la prolifération et la différenciation de ces cellules souches, les récepteurs UNC5H et DCC contrôlant quant à eux l'élimination des cellules épithéliales dans la lumière là où la Nétrine-1 est absente ; phénomène essentiel pour le renouvellement cellulaire par ailleurs nécessaire à la formation de la lumière des canaux au cours du développement (**figure 36A**). En condition tumorale, un avantage sélectif permettant une augmentation transcriptionnelle de la Nétrine-1 soit dans ces cellules souches, soit dans des

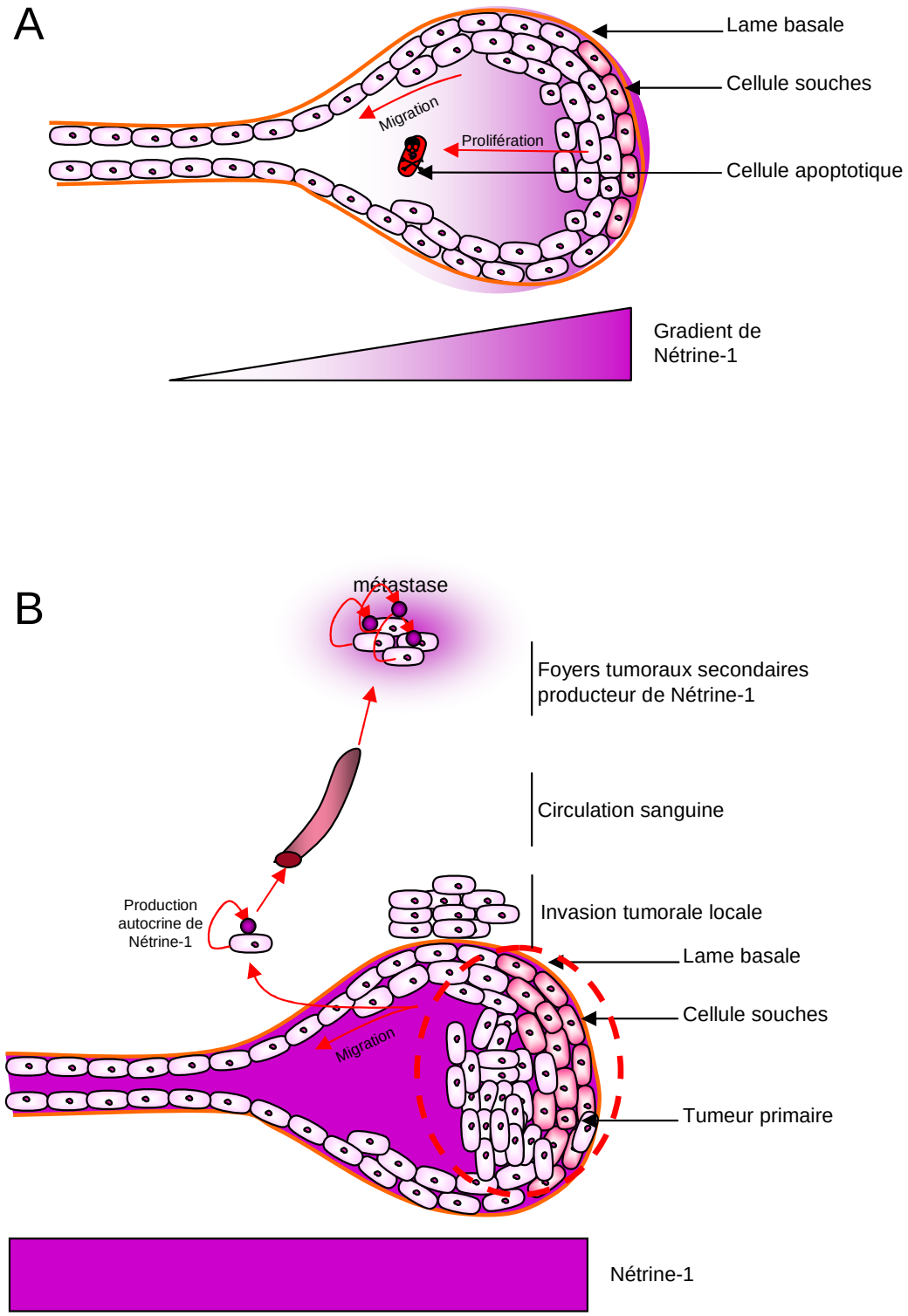


Figure 36 : Modèle général du rôle de la Nétrine-1 et de ses récepteurs UNC5H dans l'homéostasie et le contrôle de la tumorigenèse des organes branchés

A. En condition physiologique, les cellules épithéliales sont renouvelées en permanence via la prolifération de cellules souches et l'élimination des cellules les plus anciennes par apoptose. Dans les organes branchés, la Nétrine-1 et ses récepteurs UNC5H pourrait réguler cette homéostasie en formant un gradient au sein des acini : la Nétrine-1 stimulerait la prolifération des cellules souches, et l'activation de la voie apoptotique des récepteurs UNC5H permettrait l'élimination des cellules les plus anciennes (ici les plus proches de la lumière). De plus, la Nétrine-1 et ses récepteurs UNC5H pourraient également participer à l'adhésion des cellules entre-elles et à la migration cellulaire nécessaire au tapissage épithélial des acini.
B. En condition tumorale, la surexpression anormale locale ou autocrine de Nétrine-1 entraînerait d'une part une hyperprolifération des cellules souches et d'autre part une désorganisation de l'adhésion et de la migration cellulaire conduisant ainsi à la formation de tumeurs et à l'échappement de cellules tumorales des acini qui vont coloniser les tissus adjacents ou des organes plus distants (métastases). L'une des possibilités pour les cellules tumorales de s'affranchir de leur dépendance à la Nétrine-1 est l'expression autocrine de Nétrine-1 représentée ici dans le processus métastatique.

cellules progénitrices, voire dans les cellules différenciées, conduirait à une hyperprolifération des cellules souches et à une absence de l'apoptose normalement induite par les récepteurs UNC5H et DCC à l'origine de la formation d'une tumeur primaire. De plus cette surexpression de Nétrine-1 pourrait être à l'origine d'une perte de l'adhésion cellule-cellule, d'une stimulation de la migration dans les tissus adjacents et ainsi d'une invasivité tumorale locale (**figure 36B**). Enfin, une expression autocrine de la Nétrine-1 ou un fort taux de Nétrine-1 sanguin lié à la surexpression de la Nétrine-1 dans la tumeur primaire, induirait une dissémination des cellules tumorales par voie sanguine et la formation de métastases dans des sites secondaires produisant également de la Nétrine-1 maintenant la pression sélective de ces cellules immortelles (**figure 36B**).

Utilisation de la surexpression de la Nétrine-1 pour une thérapie anti-cancéreuse

Nous avons montré que le peptide DCC-5Fbn correspondant à l'un des sites de fixation de la Nétrine-1 sur DCC était capable d'induire l'apoptose de lignées tumorales surexprimant la Nétrine-1 *in vitro* et d'induire une régression tumorale de tumeurs issues de ces lignées et/ou d'inhiber la dissémination métastatique dans des modèles d'études de la tumorigenèse mammaire et pulmonaire (Delloye-Bourgeois et al., 2009a; Fitamant et al., 2008). Une autre étude menée au laboratoire a également permis de montrer un effet anti-tumoral et anti-métastatique de ce peptide sur des cellules tumorales de neuroblastomes (Delloye-Bourgeois et al., 2009b) suggérant qu'il pourrait être le prototype d'une nouvelle thérapie ciblée.

D'autre part, nous avons montré au laboratoire que l'oligomérisation du récepteur UNC5H2 ou du récepteur DCC en présence de Nétrine-1 était suffisante pour inhiber la fonction pro-apoptotique de ces récepteurs (Mille et al., 2009a). Il apparaît que le peptide DCC-5Fbn est capable d'induire la mort de cellules en culture en inhibant directement le processus d'oligomérisation du récepteur DCC. Ainsi le développement d'une thérapie ciblée contre les cancers à surexpression de Nétrine-1 pourrait correspondre (i) soit à un peptide capable d'inhiber la fixation de la Nétrine-1 sur ses récepteurs UNC5H, (ii) soit à un peptide capable d'inhiber l'oligomérisation des récepteurs UNC5H (le ciblage du récepteur DCC ne présentant pas d'intérêt en thérapie anti-tumorale puisque ce dernier n'est pas exprimé dans la plupart des cancers).

Actuellement plusieurs essais sont en cours au laboratoire afin de développer un analogue du peptide DCC-5Fbn remplissant les conditions nécessaires à une utilisation en thérapie humaine : c'est-à-dire un peptide de faible poids moléculaire, et qui soit stable au

cours du temps dans le sérum. Ainsi, le domaine précis de fixation de la Nétrine-1 sur le 5ème domaine fibronectine de DCC (une dizaine d'acides aminés) a été isolé. Par ailleurs, le peptide DCC-5Fbn (de 100 acides aminés) a été stabilisé par ajout d'un groupement des chaînes lourdes des immunnoglobulines (domaine Fc) ce qui lui confère une demi-vie de 39h dans le sérum et permet des injections intrapéritonéales ou intraveineuses seulement une ou deux fois par semaine, conditions idéales pour une thérapie. Ces peptides sont actuellement en cours de test chez la souris sur des xénogreffes de lignées tumorales humaines et les essais à venir viseront à estimer leur toxicité car, de part la fonction potentielle de la Nétrine-1 dans la régulation de l'homéostasie de nombreux tissus, un tel traitement pourrait avoir des effets secondaires. De manière encourageante, après 30 jours de traitement de tumeurs greffées, l'analyse de l'intestin des souris *nude* ne révèle pas d'augmentation de l'apoptose et par ailleurs, les souris traitées ne présentent ni problème de comportement, ni perte de poids (donnée non-publiée). De plus, il a été montré que le peptide DCC-5Fbn stabilisé était capable de se concentrer spécifiquement au niveau des xénogreffes tumorales surexprimant la Nétrine-1 et pas dans les autres organes (étude réalisée par la fusion du peptide avec le fluorochrome Cy-5, donnée non-publiée) donnant une indication supplémentaire sur une restriction plutôt tumorale du ciblage par cette molécule thérapeutique.

Par ailleurs, la Nétrine-1 étant impliquée dans le développement du système nerveux, la toxicité neurologique de ce traitement sera analysée. En particulier, la capacité du peptide à franchir la barrière hématoencéphalique afin de prévenir tout effet neurotoxique devra être étudiée.

Les tests en cours visent à traiter les cancers du poumon et du sein Nétrine-1 dépendants mais pourraient permettrent le développement d'une thérapie anti-cancéreuse plus globale contre d'autres cancers Nétrine-1 dépendants : neuroblastomes de stade IV, cancers du pancréas, mélanomes et leucémies, un criblage des autres types de cancers restant à être effectué plus systématiquement.

Par ailleurs, nous avons également évoqué le rôle de la Nétrine-1 dans les maladies inflammatoires où ses effets sont variables : dans la maladie de Crohn (inflammation intestinale) et potentiellement dans les pancréatites, la surexpression de la Nétrine-1 liée à l'activation du facteur de transcription NFκB favoriserait la tumorigenèse, alors que dans l'ostéoarthrite (inflammation articulaire), la Nétrine-1 favoriserait la migration des chondrocytes et ainsi la dégénérescence cartilagineuse. Pour ces trois pathologies, inhiber la

Nétrine-1 pourrait également être une solution thérapeutique comme l'indiquent des résultats obtenus au laboratoire chez des souris atteintes d'un cancer du colon d'origine inflammatoire.

Conclusion

La perte de la fonction apoptotique comme système de sauvegarde de l'intégrité cellulaire est l'une des caractéristiques des cellules cancéreuses et actuellement trois voies de signalisation conduisant à cette apoptose peuvent être distinguées : la voie des récepteurs de mort, la voie mitochondriale et la voie des récepteurs à dépendance plus particulièrement étudiée au laboratoire. Les thérapies ciblées visant à restaurer les voies de signalisation apoptotiques sont source d'espoir en thérapie anti-cancéreuse car elles pourraient être utilisées seules ou en association avec les chimiothérapies et ainsi améliorer l'efficacité des traitements actuels. Actuellement parmi l'ensemble des thérapies ciblées existantes seules quelques unes ciblent les voies pro-apoptotiques et plus particulièrement la voie des récepteurs de mort (ciblage de TRAIL et de ses récepteurs) et la voie mitochondriale (ciblage des protéines Bcl-2). Parmi les mutations inactivatrices des voies apoptotiques observées dans les cancers, on retrouve la perte de fonction des récepteurs de TRAIL et la surexpression de récepteurs leurres qui vont titrer et neutraliser TRAIL (ou ses agonistes thérapeutiques) ou bien encore la perte de fonction des protéines pro-apoptotiques située en aval des protéines Bcl-2 dans la cascade de signalisation apoptotique (Apaf-1 et Smac/DIABLO). Par conséquent ces traitements présentent de nombreux phénomènes de résistance. Ainsi, la voie des récepteurs à dépendance et plus particulièrement, l'inactivation tumorale de cette voie liée à la surexpression de ligand est une source d'espoir pour le développement de nouvelles thérapies ciblées impliquant une nouvelle voie d'activation de l'apoptose et faisant intervenir soit de nouveaux partenaires, soit des partenaires partageant les autres voies d'apoptose. Nous avons travaillé sur les prototypes des récepteurs à dépendance, les récepteurs à Nétrine-1 mais des résultats au laboratoire indiquent déjà que la surexpression du ligand impliquée dans les cancers pourrait concerner les ligands Neurotrophine-3 (ligand de TrkC) et Sonic Hedgehog (ligand de Patched). En effet, de manière intéressante dans les neuroblastomes de stade IV et les cancers mammaires, on retrouve à la fois une surexpression de Nétrine-1 et une

surexpression de Neurotrophine-3. Ainsi deux nouvelles perspectives thérapeutiques existeraient pour ces cancers : le ciblage de la Nétrine-1 et/ou le ciblage de la Neurotrophine 3. De la même manière, dans le pancréas on retrouve une surexpression de la Nétrine-1 et une surexpression du ligand Shh associées avec la progression tumorale. Ainsi, pour un cancer donné, plusieurs possibilités thérapeutiques basées sur l'inhibition de la surexpression des ligands des récepteurs à dépendance pourraient être développées dans l'objectif de créer des thérapies personnalisées et ciblées sur les cellules tumorales créant un panel complet de nouvelles molécules anti-cancéreuses pour donner « le bon médicament, à la bonne personne ».

.

Bibliographie

Abraira, V. E., T. Del Rio, A. F. Tucker, J. Slonimsky, H. L. Keirnes, and L. V. Goodrich, 2008, Cross-repressive interactions between Lrig3 and netrin 1 shape the architecture of the inner ear: Development, v. 135, p. 4091-9.

Ackerman, S. L., L. P. Kozak, S. A. Przyborski, L. A. Rund, B. B. Boyer, and B. B. Knowles, 1997, The mouse rostral cerebellar malformation gene encodes an UNC-5-like protein: Nature, v. 386, p. 838-42.

Allan, L. A., N. Morrice, S. Brady, G. Magee, S. Pathak, and P. R. Clarke, 2003, Inhibition of caspase-9 through phosphorylation at Thr 125 by ERK MAPK: Nat Cell Biol, v. 5, p. 647-54.

Allouche, M., 2007, ALK is a novel dependence receptor: potential implications in development and cancer: Cell Cycle, v. 6, p. 1533-8.

Balakrishnan, K., J. A. Burger, W. G. Wierda, and V. Gandhi, 2009, AT-101 induces apoptosis in CLL B cells and overcomes stromal cell-mediated Mcl-1 induction and drug resistance: Blood, v. 113, p. 149-53.

Bazigou, E., H. Apitz, J. Johansson, C. E. Loren, E. M. Hirst, P. L. Chen, R. H. Palmer, and I. Salecker, 2007, Anterograde Jelly belly and Alk receptor tyrosine kinase signaling mediates retinal axon targeting in Drosophila: Cell, v. 128, p. 961-75.

Bedikian, A. Y., M. Millward, H. Pehamberger, R. Conry, M. Gore, U. Trefzer, A. C. Pavlick, R. DeConti, E. M. Hersh, P. Hersey, J. M. Kirkwood, and F. G. Haluska, 2006, Bcl-2 antisense (oblimersen sodium) plus dacarbazine in patients with advanced melanoma: the Oblimersen Melanoma Study Group: J Clin Oncol, v. 24, p. 4738-45.

Bennett, K. L., J. Bradshaw, T. Youngman, J. Rodgers, B. Greenfield, A. Aruffo, and P. S. Linsley, 1997, Deleted in colorectal carcinoma (DCC) binds heparin via its fifth fibronectin type III domain: J Biol Chem, v. 272, p. 26940-6.

Bernet, A., and J. Fitamant, 2008, Netrin-1 and its receptors in tumour growth promotion: Expert Opin Ther Targets, v. 12, p. 995-1007.

Bernet, A., L. Mazelin, M. M. Coissieux, N. Gadot, S. L. Ackerman, J. Y. Scoazec, and P. Mehlen, 2007, Inactivation of the UNC5C Netrin-1 receptor is associated with tumor progression in colorectal malignancies: Gastroenterology, v. 133, p. 1840-8.

Bharti, A. C., and B. B. Aggarwal, 2002, Nuclear factor-kappa B and cancer: its role in prevention and therapy: Biochem Pharmacol, v. 64, p. 883-8.

Bloch-Gallego, E., F. Ezan, M. Tessier-Lavigne, and C. Sotelo, 1999, Floor plate and netrin-1 are involved in the migration and survival of inferior olivary neurons: J Neurosci, v. 19, p. 4407-20.

Bordeaux, M. C., C. Forcet, L. Granger, V. Corset, C. Bidaud, M. Billaud, D. E. Bredesen, P. Edery, and P. Mehlen, 2000, The RET proto-oncogene induces apoptosis: a novel mechanism for Hirschsprung disease: Embo J, v. 19, p. 4056-63.

Borysenko, C. W., V. Garcia-Palacios, R. D. Griswold, Y. Li, A. K. Iyer, B. B. Yaroslavskiy, A. C. Sharrow, and H. C. Blair, 2006, Death receptor-3 mediates apoptosis in human osteoblasts under narrowly regulated conditions: J Cell Physiol, v. 209, p. 1021-8.

Brady, S. C., L. A. Allan, and P. R. Clarke, 2005, Regulation of caspase 9 through phosphorylation by protein kinase C zeta in response to hyperosmotic stress: Mol Cell Biol, v. 25, p. 10543-55.

Bredesen, D. E., P. Mehlen, and S. Rabizadeh, 2005, Receptors that mediate cellular dependence: Cell Death Differ, v. 12, p. 1031-43.

Bredesen, D. E., R. V. Rao, and P. Mehlen, 2006, Cell death in the nervous system: Nature, v. 443, p. 796-802.

Brennan, C., K. Rivas-Plata, and S. C. Landis, 1999, The p75 neurotrophin receptor influences NT-3 responsiveness of sympathetic neurons in vivo: Nat Neurosci, v. 2, p. 699-705.

Briancon-Marjollet, A., A. Ghogha, H. Nawabi, I. Triki, C. Auziol, S. Fromont, C. Piche, H. Enslen, K. Chebli, J. F. Cloutier, V. Castellani, A. Debant, and N. Lamarche-Vane, 2008, Trio mediates

netrin-1-induced Rac1 activation in axon outgrowth and guidance: Mol Cell Biol, v. 28, p. 2314-23.

Bulavin, D. V., and A. J. Fornace, Jr., 2004, p38 MAP kinase's emerging role as a tumor suppressor: Adv Cancer Res, v. 92, p. 95-118.

Bulavin, D. V., Y. Higashimoto, I. J. Popoff, W. A. Gaarde, V. Basrur, O. Potapova, E. Appella, and A. J. Fornace, Jr., 2001, Initiation of a G2/M checkpoint after ultraviolet radiation requires p38 kinase: Nature, v. 411, p. 102-7.

Bushunow, P., M. M. Reidenberg, J. Wasenko, J. Winfield, B. Lorenzo, S. Lemke, B. Himpler, R. Corona, and T. Coyle, 1999, Gossypol treatment of recurrent adult malignant gliomas: J Neurooncol, v. 43, p. 79-86.

Cardone, M. H., N. Roy, H. R. Stennicke, G. S. Salvesen, T. F. Franke, E. Stanbridge, S. Frisch, and J. C. Reed, 1998, Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation: Science, v. 282, p. 1318-21.

Cardoso, W. V., 2000, Lung morphogenesis revisited: old facts, current ideas: Dev Dyn, v. 219, p. 121-30.

Castets, M., M. M. Coissieux, C. Delloye-Bourgeois, L. Bernard, J. G. Delcros, A. Bernet, V. Laudet, and P. Mehlen, 2009, Inhibition of endothelial cell apoptosis by netrin-1 during angiogenesis: Dev Cell, v. 16, p. 614-20.

Castets M., C. M. M., Delloye-Bourgeois C., Bernard L., Delcros J.G, Bernet A., Laudet V. and P. Mehlen 2009, Inhibition of endothelial cell apoptosis by netrin-1 during angiogenesis.: Dev Cell, v. In Press.

Cayuso, J., F. Ulloa, B. Cox, J. Briscoe, and E. Marti, 2006, The Sonic hedgehog pathway independently controls the patterning, proliferation and survival of neuroepithelial cells by regulating Gli activity: Development, v. 133, p. 517-28.

Cazanave, S. C., J. L. Mott, N. A. Elmi, S. F. Bronk, N. W. Werneburg, Y. Akazawa, A. Kahraman, S. P. Garrison, G. P. Zambetti, M. R. Charlton, and G. J. Gores, 2009, JNK1-dependent PUMA expression contributes to hepatocyte lipoapoptosis: J Biol Chem, v. 284, p. 26591-602.

Chai, J., C. Du, J. W. Wu, S. Kyin, X. Wang, and Y. Shi, 2000, Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO: Nature, v. 406, p. 855-62.

Chai, J., E. Shiozaki, S. M. Srinivasula, Q. Wu, P. Datta, E. S. Alnemri, and Y. Shi, 2001, Structural basis of caspase-7 inhibition by XIAP: Cell, v. 104, p. 769-80.

Chan, S. S., H. Zheng, M. W. Su, R. Wilk, M. T. Killeen, E. M. Hedgecock, and J. G. Culotti, 1996, UNC-40, a C. elegans homolog of DCC (Deleted in Colorectal Cancer), is required in motile cells responding to UNC-6 netrin cues: Cell, v. 87, p. 187-95.

Chatfield, K., and A. Eastman, 2004, Inhibitors of protein phosphatases 1 and 2A differentially prevent intrinsic and extrinsic apoptosis pathways: Biochem Biophys Res Commun, v. 323, p. 1313-20.

Chipuk, J. E., J. C. Fisher, C. P. Dillon, R. W. Kriwacki, T. Kuwana, and D. R. Green, 2008, Mechanism of apoptosis induction by inhibition of the anti-apoptotic BCL-2 proteins: Proc Natl Acad Sci U S A, v. 105, p. 20327-32.

Chou, H. C., C. H. Chen, H. S. Lee, C. Z. Lee, G. T. Huang, P. M. Yang, P. H. Lee, and J. C. Sheu, 2007, Alterations of tumour suppressor gene PPP2R1B in hepatocellular carcinoma: Cancer Lett, v. 253, p. 138-43.

Chu, C. S., B. Xue, C. Tu, Z. H. Feng, Y. H. Shi, Y. Miao, and C. J. Wen, 2007, NRAGE suppresses metastasis of melanoma and pancreatic cancer in vitro and in vivo: Cancer Lett, v. 250, p. 268-75.

Clancy, L., K. Mruk, K. Archer, M. Woelfel, J. Mongkolsapaya, G. Screaton, M. J. Lenardo, and F. K. Chan, 2005, Preligand assembly domain-mediated ligand-independent association between TRAIL receptor 4 (TR4) and TR2 regulates TRAIL-induced apoptosis: Proc Natl Acad Sci U S A, v. 102, p. 18099-104.

Connolly, K., Y. H. Cho, R. Duan, J. Fikes, T. Gregorio, D. W. LaFleur, Z. Okoye, T. W. Salcedo, G. Santiago, S. Ullrich, P. Wei, K. Windle, E. Wong, X. T. Yao, Y. Q. Zhang, G. Zheng, and P. A. Moore, 2001, In vivo inhibition of Fas ligand-mediated killing by TR6, a Fas ligand decoy receptor: J Pharmacol Exp Ther, v. 298, p. 25-33.

Corset, V., K. T. Nguyen-Ba-Charvet, C. Forcet, E. Moyse, A. Chedotal, and P. Mehlen, 2000, Netrin-1-mediated axon outgrowth and cAMP production requires interaction with adenosine A2b receptor: Nature, v. 407, p. 747-50.

Courter, D. L., L. Lomas, M. Scatena, and C. M. Giachelli, 2005, Src kinase activity is required for integrin alphaVbeta3-mediated activation of nuclear factor-kappaB: J Biol Chem, v. 280, p. 12145-51.

Cretney, E., K. Takeda, H. Yagita, M. Glaccum, J. J. Peschon, and M. J. Smyth, 2002, Increased susceptibility to tumor initiation and metastasis in TNF-related apoptosis-inducing ligand-deficient mice: J Immunol, v. 168, p. 1356-61.

Dalvin, S., M. A. Anselmo, P. Prodhan, K. Komatsuzaki, J. J. Schnitzer, and T. B. Kinane, 2003, Expression of Netrin-1 and its two receptors DCC and UNC5H2 in the developing mouse lung: Gene Expr Patterns, v. 3, p. 279-83.

Dan, H. C., M. Sun, S. Kaneko, R. I. Feldman, S. V. Nicosia, H. G. Wang, B. K. Tsang, and J. Q. Cheng, 2004, Akt phosphorylation and stabilization of X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP): J Biol Chem, v. 279, p. 5405-12.

Daniel, C. W., P. Strickland, and Y. Friedmann, 1995, Expression and functional role of E- and P-cadherins in mouse mammary ductal morphogenesis and growth: Dev Biol, v. 169, p. 511-9.

Dash, P. R., J. McCormick, M. J. Thomson, A. P. Johnstone, J. E. Cartwright, and G. S. Whitley, 2007, Fas ligand-induced apoptosis is regulated by nitric oxide through the inhibition of fas receptor clustering and the nitrosylation of protein kinase Cepsilon: Exp Cell Res, v. 313, p. 3421-31.

De Breuck, S., J. Lardon, I. Rooman, and L. Bouwens, 2003, Netrin-1 expression in fetal and regenerating rat pancreas and its effect on the migration of human pancreatic duct and porcine islet precursor cells: Diabetologia, v. 46, p. 926-33.

Delloye-Bourgeois, C., E. Brambilla, M. M. Coissieux, C. Guenebeaud, R. Pedeux, V. Firlej, F. Cabon, C. Brambilla, P. Mehlen, and A. Bernet, 2009a, Interference with netrin-1 and tumor cell death in non-small cell lung cancer: J Natl Cancer Inst, v. 101, p. 237-47.

Delloye-Bourgeois, C., J. Fitamant, A. Paradisi, D. Cappellen, S. Douc-Rasy, M. A. Raquin, D. Stupack, A. Nakagawara, R. Rousseau, V. Combaret, A. Puisieux, D. Valteau-Couanet, J. Benard, A. Bernet, and P. Mehlen, 2009b, Netrin-1 acts as a survival factor for aggressive neuroblastoma: J Exp Med, v. 206, p. 833-47.

Denmeade, S. R., X. S. Lin, B. Tombal, and J. T. Isaacs, 1999, Inhibition of caspase activity does not prevent the signaling phase of apoptosis in prostate cancer cells: Prostate, v. 39, p. 269-79.

DeRosa, D. C., P. J. Ryan, A. Okragly, D. R. Witcher, and R. J. Benschop, 2008, Tumor-derived death receptor 6 modulates dendritic cell development: Cancer Immunol Immunother, v. 57, p. 777-87.

Dhanasekaran, D. N., and E. P. Reddy, 2008, JNK signaling in apoptosis: Oncogene, v. 27, p. 6245-51.

Di Certo, M. G., N. Corbi, T. Bruno, S. Iezzi, F. De Nicola, A. Desantis, M. T. Ciotti, E. Mattei, A. Floridi, M. Fanciulli, and C. Passananti, 2007, NRAGE associates with the anti-apoptotic factor Che-1 and regulates its degradation to induce cell death: J Cell Sci, v. 120, p. 1852-8.

Dillon, A. K., A. R. Jevince, L. Hinck, S. L. Ackerman, X. Lu, M. Tessier-Lavigne, and Z. Kaprielian, 2007, UNC5C is required for spinal accessory motor neuron development: Mol Cell Neurosci, v. 35, p. 482-9.

Du, C., M. Fang, Y. Li, L. Li, and X. Wang, 2000, Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition: Cell, v. 102, p. 33-42.

Edelblum, K. L., J. A. Goettel, T. Koyama, S. J. McElroy, F. Yan, and D. B. Polk, 2008, TNFR1 promotes tumor necrosis factor-mediated mouse colon epithelial cell survival through RAF activation of NF-kappaB: J Biol Chem, v. 283, p. 29485-94.

Eichhorn, P. J., M. P. Creyghton, and R. Bernards, 2009, Protein phosphatase 2A regulatory subunits and cancer: Biochim Biophys Acta, v. 1795, p. 1-15.

Eisenberg-Lerner, A., and A. Kimchi, 2007, DAP kinase regulates JNK signaling by binding and activating protein kinase D under oxidative stress: Cell Death Differ, v. 14, p. 1908-15.

Eliceiri, B. P., X. S. Puente, J. D. Hood, D. G. Stupack, D. D. Schlaepfer, X. Z. Huang, D. Sheppard, and D. A. Cheresh, 2002, Src-mediated coupling of focal adhesion kinase to integrin alpha(v)beta5 in vascular endothelial growth factor signaling: J Cell Biol, v. 157, p. 149-60.

Ellerby, L. M., A. S. Hackam, S. S. Propp, H. M. Ellerby, S. Rabizadeh, N. R. Cashman, M. A. Trifiro, L. Pinsky, C. L. Wellington, G. S. Salvesen, M. R. Hayden, and D. E. Bredesen, 1999, Kennedy's disease: caspase cleavage of the androgen receptor is a crucial event in cytotoxicity: J Neurochem, v. 72, p. 185-95.

Emery, J. G., P. McDonnell, M. B. Burke, K. C. Deen, S. Lyn, C. Silverman, E. Dul, E. R. Appelbaum, C. Eichman, R. DiPrinzio, R. A. Dodds, I. E. James, M. Rosenberg, J. C. Lee, and P. R. Young, 1998, Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL: J Biol Chem, v. 273, p. 14363-7.

Englund, C., C. E. Loren, C. Grabbe, G. K. Varshney, F. Deleuil, B. Hallberg, and R. H. Palmer, 2003, Jeb signals through the Alk receptor tyrosine kinase to drive visceral muscle fusion: Nature, v. 425, p. 512-6.

Eramo, A., M. Sargiacomo, L. Ricci-Vitiani, M. Todaro, G. Stassi, C. G. Messina, I. Parolini, F. Lotti, G. Sette, C. Peschle, and R. De Maria, 2004, CD95 death-inducing signaling complex formation and internalization occur in lipid rafts of type I and type II cells: Eur J Immunol, v. 34, p. 1930-40.

Ernfors, P., K. F. Lee, and R. Jaenisch, 1994a, Mice lacking brain-derived neurotrophic factor develop with sensory deficits: Nature, v. 368, p. 147-50.

Ernfors, P., K. F. Lee, J. Kucera, and R. Jaenisch, 1994b, Lack of neurotrophin-3 leads to deficiencies in the peripheral nervous system and loss of limb proprioceptive afferents: Cell, v. 77, p. 503-12.

Esplin, E. D., P. Ramos, B. Martinez, G. E. Tomlinson, M. C. Mumby, and G. A. Evans, 2006, The glycine 90 to aspartate alteration in the Abeta subunit of PP2A (PPP2R1B) associates with breast cancer and causes a deficit in protein function: Genes Chromosomes Cancer, v. 45, p. 182-90.

Fanger, N. A., C. R. Maliszewski, K. Schooley, and T. S. Griffith, 1999, Human dendritic cells mediate cellular apoptosis via tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL): J Exp Med, v. 190, p. 1155-64.

Fazeli, A., S. L. Dickinson, M. L. Hermiston, R. V. Tighe, R. G. Steen, C. G. Small, E. T. Stoeckli, K. Keino-Masu, M. Masu, H. Rayburn, J. Simons, R. T. Bronson, J. I. Gordon, M. Tessier-Lavigne, and R. A. Weinberg, 1997, Phenotype of mice lacking functional Deleted in colorectal cancer (Dcc) gene: Nature, v. 386, p. 796-804.

Fitamant, J., C. Guenebeaud, M. M. Coissieux, C. Guix, I. Treilleux, J. Y. Scoazec, T. Bachelot, A. Bernet, and P. Mehlen, 2008, Netrin-1 expression confers a selective advantage for tumor cell survival in metastatic breast cancer: Proc Natl Acad Sci U S A, v. 105, p. 4850-5.

Foghsgaard, L., D. Wissing, D. Mauch, U. Lademann, L. Bastholm, M. Boes, F. Elling, M. Leist, and M. Jaattela, 2001, Cathepsin B acts as a dominant execution protease in tumor cell apoptosis induced by tumor necrosis factor: J Cell Biol, v. 153, p. 999-1010.

Forcet, C., E. Stein, L. Pays, V. Corset, F. Llambi, M. Tessier-Lavigne, and P. Mehlen, 2002, Netrin-1-mediated axon outgrowth requires deleted in colorectal cancer-dependent MAPK activation: Nature, v. 417, p. 443-7.

Franke, T. F., 2008, PI3K/Akt: getting it right matters: Oncogene, v. 27, p. 6473-88.

French, L. E., and J. Tschopp, 2003, Protein-based therapeutic approaches targeting death receptors: Cell Death Differ, v. 10, p. 117-23.

Fujita, Y., J. Taniguchi, M. Uchikawa, M. Endo, K. Hata, T. Kubo, B. K. Mueller, and T. Yamashita, 2008, Neogenin regulates neuronal survival through DAP kinase: Cell Death Differ, v. 15, p. 1593-608.

Furne, C., V. Corset, Z. Herincs, N. Cahuzac, A. O. Hueber, and P. Mehlen, 2006, The dependence receptor DCC requires lipid raft localization for cell death signaling: Proc Natl Acad Sci U S A, v. 103, p. 4128-33.

Furne, C., N. Rama, V. Corset, A. Chedotal, and P. Mehlen, 2008, Netrin-1 is a survival factor during commissural neuron navigation: Proc Natl Acad Sci U S A, v. 105, p. 14465-70.

Furne, C., J. Ricard, J. R. Cabrera, L. Pays, J. R. Bethea, P. Mehlen, and D. J. Liebl, 2009, EphrinB3 is an anti-apoptotic ligand that inhibits the dependence receptor functions of EphA4 receptors during adult neurogenesis: Biochim Biophys Acta, v. 1793, p. 231-8.

Gafni, J., X. Cong, S. F. Chen, B. W. Gibson, and L. M. Ellerby, 2009, Calpain-1 cleaves and activates caspase-7: J Biol Chem, v. 284, p. 25441-9.

Ganten, T. M., J. Sykora, R. Koschny, E. Batke, S. Aulmann, U. Mansmann, W. Stremmel, H. P. Sinn, and H. Walczak, 2009, Prognostic significance of tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptor expression in patients with breast cancer: J Mol Med, v. 87, p. 995-1007.

Geisbrecht, B. V., K. A. Dowd, R. W. Barfield, P. A. Longo, and D. J. Leahy, 2003, Netrin binds discrete subdomains of DCC and UNC5 and mediates interactions between DCC and heparin: J Biol Chem, v. 278, p. 32561-8.

Giam, M., D. C. Huang, and P. Bouillet, 2008, BH3-only proteins and their roles in programmed cell death: Oncogene, v. 27 Suppl 1, p. S128-36.

Giles, F. J., M. O'Dwyer, and R. Swords, 2009, Class effects of tyrosine kinase inhibitors in the treatment of chronic myeloid leukemia: Leukemia, v. 23, p. 1698-707.

Gloire, G., E. Charlier, and J. Piette, 2008, Regulation of CD95/APO-1/Fas-induced apoptosis by protein phosphatases: Biochem Pharmacol, v. 76, p. 1451-8.

Gozuacik, D., S. Bialik, T. Raveh, G. Mitou, G. Shohat, H. Sabanay, N. Mizushima, T. Yoshimori, and A. Kimchi, 2008, DAP-kinase is a mediator of endoplasmic reticulum stress-induced caspase activation and autophagic cell death: Cell Death Differ, v. 15, p. 1875-86.

Graef, I. A., F. Wang, F. Charron, L. Chen, J. Neilson, M. Tessier-Lavigne, and G. R. Crabtree, 2003, Neurotrophins and netrins require calcineurin/NFAT signaling to stimulate outgrowth of embryonic axons: Cell, v. 113, p. 657-70.

Granci, V., F. Bibeau, A. Kramar, F. Boissiere-Michot, S. Thezenas, A. Thirion, C. Gongora, P. Martineau, M. Del Rio, and M. Ychou, 2008, Prognostic significance of TRAIL-R1 and TRAIL-R3 expression in metastatic colorectal carcinomas: Eur J Cancer, v. 44, p. 2312-8.

Griffith, T. S., S. R. Wiley, M. Z. Kubin, L. M. Sedger, C. R. Maliszewski, and N. A. Fanger, 1999, Monocyte-mediated tumoricidal activity via the tumor necrosis factor-related cytokine, TRAIL: J Exp Med, v. 189, p. 1343-54.

Grisham, M. B., 1999, NF-kappaB activation in acute pancreatitis: protective, detrimental, or inconsequential?: Gastroenterology, v. 116, p. 489-92.

Hakem, R., A. Hakem, G. S. Duncan, J. T. Henderson, M. Woo, M. S. Soengas, A. Elia, J. L. de la Pompa, D. Kagi, W. Khoo, J. Potter, R. Yoshida, S. A. Kaufman, S. W. Lowe, J. M. Penninger, and T. W. Mak, 1998, Differential requirement for caspase 9 in apoptotic pathways in vivo: Cell, v. 94, p. 339-52.

Hay, B. A., D. A. Wassarman, and G. M. Rubin, 1995, Drosophila homologs of baculovirus inhibitor of apoptosis proteins function to block cell death: Cell, v. 83, p. 1253-62.

Hedgecock, E. M., J. G. Culotti, and D. H. Hall, 1990, The unc-5, unc-6, and unc-40 genes guide circumferential migrations of pioneer axons and mesodermal cells on the epidermis in C. elegans: Neuron, v. 4, p. 61-85.

Hemmer, S., V. M. Wasenius, C. Haglund, Y. Zhu, S. Knuutila, K. Franssila, and H. Joensuu, 2002, Alterations in the suppressor gene PPP2R1B in parathyroid hyperplasias and adenomas: Cancer Genet Cytogenet, v. 134, p. 13-7.

Herincs, Z., V. Corset, N. Cahuzac, C. Furne, V. Castellani, A. O. Hueber, and P. Mehlen, 2005, DCC association with lipid rafts is required for netrin-1-mediated axon guidance: J Cell Sci, v. 118, p. 1687-92.

Hirsch, T., P. Marchetti, S. A. Susin, B. Dallaporta, N. Zamzami, I. Marzo, M. Geuskens, and G. Kroemer, 1997, The apoptosis-necrosis paradox. Apoptogenic proteases activated after mitochondrial permeability transition determine the mode of cell death: Oncogene, v. 15, p. 1573-81.

Holler, N., R. Zaru, O. Micheau, M. Thome, A. Attinger, S. Valitutti, J. L. Bodmer, P. Schneider, B. Seed, and J. Tschopp, 2000, Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule: Nat Immunol, v. 1, p. 489-95.

Holmstrom, T. H., I. Schmitz, T. S. Soderstrom, M. Poukkula, V. L. Johnson, S. C. Chow, P. H. Krammer, and J. E. Eriksson, 2000, MAPK/ERK signaling in activated T cells inhibits CD95/Fas-mediated apoptosis downstream of DISC assembly: Embo J, v. 19, p. 5418-28.

Holoch, P. A., and T. S. Griffith, 2009, TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL): A new path to anti-cancer therapies: Eur J Pharmacol.

Hong, K., L. Hinck, M. Nishiyama, M. M. Poo, M. Tessier-Lavigne, and E. Stein, 1999, A ligand-gated association between cytoplasmic domains of UNC5 and DCC family receptors converts netrin-induced growth cone attraction to repulsion: Cell, v. 97, p. 927-41.

Hoon, D. S., M. Spugnardi, C. Kuo, S. K. Huang, D. L. Morton, and B. Taback, 2004, Profiling epigenetic inactivation of tumor suppressor genes in tumors and plasma from cutaneous melanoma patients: Oncogene, v. 23, p. 4014-22.

Hur, J., D. W. Bell, K. L. Dean, K. R. Coser, P. C. Hilario, R. A. Okimoto, E. M. Tobey, S. L. Smith, K. J. Isselbacher, and T. Shioda, 2006, Regulation of expression of BIK proapoptotic protein in human breast cancer cells: p53-dependent induction of BIK mRNA by fulvestrant and proteasomal degradation of BIK protein: Cancer Res, v. 66, p. 10153-61.

Hurwitz, H., L. Fehrenbacher, W. Novotny, T. Cartwright, J. Hainsworth, W. Heim, J. Berlin, A. Baron, S. Griffing, E. Holmgren, N. Ferrara, G. Fyfe, B. Rogers, R. Ross, and F. Kabbinavar, 2004, Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer: N Engl J Med, v. 350, p. 2335-42.

Irmler, M., M. Thome, M. Hahne, P. Schneider, K. Hofmann, V. Steiner, J. L. Bodmer, M. Schroter, K. Burns, C. Mattmann, D. Rimoldi, L. E. French, and J. Tschopp, 1997, Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP: Nature, v. 388, p. 190-5.

Jeong, J. C., M. S. Kim, T. H. Kim, and Y. K. Kim, 2009, Kaempferol induces cell death through ERK and Akt-dependent down-regulation of XIAP and survivin in human glioma cells: Neurochem Res, v. 34, p. 991-1001.

Jia, W., C. Yu, M. Rahmani, G. Krystal, E. A. Sausville, P. Dent, and S. Grant, 2003, Synergistic antileukemic interactions between 17-AAG and UCN-01 involve interruption of RAF/MEK- and AKT-related pathways: Blood, v. 102, p. 1824-32.

Johansson, N., R. Ala-aho, V. Uitto, R. Grenman, N. E. Fusenig, C. Lopez-Otin, and V. M. Kahari, 2000, Expression of collagenase-3 (MMP-13) and collagenase-1 (MMP-1) by transformed keratinocytes is dependent on the activity of p38 mitogen-activated protein kinase: J Cell Sci, v. 113 Pt 2, p. 227-35.

Jones, K. L., and A. U. Buzdar, 2009, Evolving novel anti-HER2 strategies: Lancet Oncol, v. 10, p. 1179-87.

Jordan, B. W., D. Dinev, V. LeMellay, J. Troppmair, R. Gotz, L. Wixler, M. Sendtner, S. Ludwig, and U. R. Rapp, 2001, Neurotrophin receptor-interacting mage homologue is an inducible inhibitor of apoptosis protein-interacting protein that augments cell death: J Biol Chem, v. 276, p. 39985-9.

Jost, P. J., S. Grabow, D. Gray, M. D. McKenzie, U. Nachbur, D. C. Huang, P. Bouillet, H. E. Thomas, C. Borner, J. Silke, A. Strasser, and T. Kaufmann, 2009, XIAP discriminates between type I and type II FAS-induced apoptosis: Nature, v. 460, p. 1035-9.

Junttila, M. R., R. Ala-Aho, T. Jokilehto, J. Peltonen, M. Kallajoki, R. Grenman, P. Jaakkola, J. Westermarck, and V. M. Kahari, 2007a, p38alpha and p38delta mitogen-activated protein kinase isoforms regulate invasion and growth of head and neck squamous carcinoma cells: Oncogene, v. 26, p. 5267-79.

Junttila, M. R., S. P. Li, and J. Westermarck, 2008, Phosphatase-mediated crosstalk between MAPK signaling pathways in the regulation of cell survival: Faseb J, v. 22, p. 954-65.

Junttila, M. R., P. Puustinen, M. Niemela, R. Ahola, H. Arnold, T. Bottzauw, R. Ala-aho, C. Nielsen, J. Ivaska, Y. Taya, S. L. Lu, S. Lin, E. K. Chan, X. J. Wang, R. Grenman, J. Kast, T. Kallunki, R. Sears, V. M. Kahari, and J. Westermarck, 2007b, CIP2A inhibits PP2A in human malignancies: Cell, v. 130, p. 51-62.

Junttila, M. R., and J. Westermarck, 2008, Mechanisms of MYC stabilization in human malignancies: Cell Cycle, v. 7, p. 592-6.

Junttila, T. T., R. W. Akita, K. Parsons, C. Fields, G. D. Lewis Phillips, L. S. Friedman, D. Sampath, and M. X. Sliwkowski, 2009, Ligand-independent HER2/HER3/PI3K complex is disrupted by trastuzumab and is effectively inhibited by the PI3K inhibitor GDC-0941: Cancer Cell, v. 15, p. 429-40.

Kamata, H., S. Honda, S. Maeda, L. Chang, H. Hirata, and M. Karin, 2005, Reactive oxygen species promote TNFalpha-induced death and sustained JNK activation by inhibiting MAP kinase phosphatases: Cell, v. 120, p. 649-61.

Kaufmann, S., S. Kuphal, T. Schubert, and A. K. Bosserhoff, 2009, Functional implication of Netrin expression in malignant melanoma: Cell Oncol, v. 31, p. 415-22.

Kaufmann, T., L. Tai, P. G. Ekert, D. C. Huang, F. Norris, R. K. Lindemann, R. W. Johnstone, V. M. Dixit, and A. Strasser, 2007, The BH3-only protein bid is dispensable for DNA damage- and replicative stress-induced apoptosis or cell-cycle arrest: Cell, v. 129, p. 423-33.

Keino-Masu, K., M. Masu, L. Hinck, E. D. Leonardo, S. S. Chan, J. G. Culotti, and M. Tessier-Lavigne, 1996, Deleted in Colorectal Cancer (DCC) encodes a netrin receptor: Cell, v. 87, p. 175-85.

Kendall, S. E., C. Battelli, S. Irwin, J. G. Mitchell, C. A. Glackin, and J. M. Verdi, 2005, NRAGE mediates p38 activation and neural progenitor apoptosis via the bone morphogenetic protein signaling cascade: Mol Cell Biol, v. 25, p. 7711-24.

Khanna, A., C. Bockelman, A. Hemmes, M. R. Junttila, J. P. Wiksten, M. Lundin, S. Junnila, D. J. Murphy, G. I. Evan, C. Haglund, J. Westermarck, and A. Ristimaki, 2009, MYC-dependent regulation and prognostic role of CIP2A in gastric cancer: J Natl Cancer Inst, v. 101, p. 793-805.

Kline, M. P., S. V. Rajkumar, M. M. Timm, T. K. Kimlinger, J. L. Haug, J. A. Lust, P. R. Greipp, and S. Kumar, 2008, R-(-)-gossypol (AT-101) activates programmed cell death in multiple myeloma cells: Exp Hematol, v. 36, p. 568-76.

Krepela, E., P. Dankova, E. Moravcikova, A. Krepelova, J. Prochazka, J. Cermak, J. Schutzner, P. Zatloukal, and K. Benkova, 2009, Increased expression of inhibitor of apoptosis proteins, survivin and XIAP, in non-small cell lung carcinoma: Int J Oncol, v. 35, p. 1449-62.

Krueger, A., I. Schmitz, S. Baumann, P. H. Krammer, and S. Kirchhoff, 2001, Cellular FLICE-inhibitory protein splice variants inhibit different steps of caspase-8 activation at the CD95 death-inducing signaling complex: J Biol Chem, v. 276, p. 20633-40.

Kruger, R. P., J. Lee, W. Li, and K. L. Guan, 2004, Mapping netrin receptor binding reveals domains of Unc5 regulating its tyrosine phosphorylation: J Neurosci, v. 24, p. 10826-34.

Krumschnabel, G., C. Manzl, and A. Villunger, 2009, Caspase-2: killer, savior and safeguard--emerging versatile roles for an ill-defined caspase: Oncogene, v. 28, p. 3093-6.

Kurokawa, M., and S. Kornbluth, 2009, Caspases and kinases in a death grip: Cell, v. 138, p. 838-54.

LA, O. R., L. Tai, L. Lee, E. A. Kruse, S. Grabow, W. D. Fairlie, N. M. Haynes, D. M. Tarlinton, J. G. Zhang, G. T. Belz, M. J. Smyth, P. Bouillet, L. Robb, and A. Strasser, 2009, Membrane-bound Fas ligand only is essential for Fas-induced apoptosis: Nature, v. 461, p. 659-63.

LaFevre-Bernt, M. A., and L. M. Ellerby, 2003, Kennedy's disease. Phosphorylation of the polyglutamine-expanded form of androgen receptor regulates its cleavage by caspase-3 and enhances cell death: J Biol Chem, v. 278, p. 34918-24.

Lanneau, D., A. de Thonel, S. Maurel, C. Didelot, and C. Garrido, 2007, Apoptosis versus cell differentiation: role of heat shock proteins HSP90, HSP70 and HSP27: Prion, v. 1, p. 53-60.

Lavrik, I., A. Golks, and P. H. Krammer, 2005, Death receptor signaling: J Cell Sci, v. 118, p. 265-7.

Lee, H. H., A. Norris, J. B. Weiss, and M. Frasch, 2003, Jelly belly protein activates the receptor tyrosine kinase Alk to specify visceral muscle pioneers: Nature, v. 425, p. 507-12.

Legge, K. L., and T. J. Braciale, 2005, Lymph node dendritic cells control CD8+ T cell responses through regulated FasL expression: Immunity, v. 23, p. 649-59.

Leone, A. M., M. Errico, S. L. Lin, and D. S. Cowen, 2000, Activation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) and Akt by human serotonin 5-HT(1B) receptors in transfected BE(2)-C neuroblastoma cells is inhibited by RGS4: J Neurochem, v. 75, p. 934-8.

Li, K., Y. Li, J. M. Shelton, J. A. Richardson, E. Spencer, Z. J. Chen, X. Wang, and R. S. Williams, 2000, Cytochrome c deficiency causes embryonic lethality and attenuates stress-induced apoptosis: Cell, v. 101, p. 389-99.

Li, L. Y., X. Luo, and X. Wang, 2001, Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria: Nature, v. 412, p. 95-9.

Li, S., L. Wang, M. A. Berman, Y. Zhang, and M. E. Dorf, 2006a, RNAi screen in mouse astrocytes identifies phosphatases that regulate NF-kappaB signaling: Mol Cell, v. 24, p. 497-509.

Li, W., J. Aurandt, C. Jurgensen, Y. Rao, and K. L. Guan, 2006b, FAK and Src kinases are required for netrin-induced tyrosine phosphorylation of UNC5: J Cell Sci, v. 119, p. 47-55.

Li, X., M. Meriane, I. Triki, M. Shekarabi, T. E. Kennedy, L. Larose, and N. Lamarche-Vane, 2002, The adaptor protein Nck-1 couples the netrin-1 receptor DCC (deleted in colorectal cancer) to the activation of the small GTPase Rac1 through an atypical mechanism: J Biol Chem, v. 277, p. 37788-97.

Link, B. C., U. Reichelt, M. Schreiber, J. T. Kaifi, R. Wachowiak, D. Bogoevski, M. Bubenheim, G. Cataldegirmen, K. A. Gawad, R. Issa, S. Koops, J. R. Izbicki, and E. F. Yekebas, 2007, Prognostic implications of netrin-1 expression and its receptors in patients with adenocarcinoma of the pancreas: Ann Surg Oncol, v. 14, p. 2591-9.

Liu, G., W. Li, X. Gao, X. Li, C. Jurgensen, H. T. Park, N. Y. Shin, J. Yu, M. L. He, S. K. Hanks, J. Y. Wu, K. L. Guan, and Y. Rao, 2007, p130CAS is required for netrin signaling and commissural axon guidance: J Neurosci, v. 27, p. 957-68.

Liu, G., W. Li, L. Wang, A. Kar, K. L. Guan, Y. Rao, and J. Y. Wu, 2009, DSCAM functions as a netrin receptor in commissural axon pathfinding: Proc Natl Acad Sci U S A, v. 106, p. 2951-6.

Liu, J., F. Yao, R. Wu, M. Morgan, A. Thorburn, R. L. Finley, Jr., and Y. Q. Chen, 2002, Mediation of the DCC apoptotic signal by DIP13 alpha: J Biol Chem, v. 277, p. 26281-5.

Liu, Y., E. Stein, T. Oliver, Y. Li, W. J. Brunken, M. Koch, M. Tessier-Lavigne, and B. L. Hogan, 2004, Novel role for Netrins in regulating epithelial behavior during lung branching morphogenesis: Curr Biol, v. 14, p. 897-905.

Llambi, F., F. Causeret, E. Bloch-Gallego, and P. Mehlen, 2001, Netrin-1 acts as a survival factor via its receptors UNC5H and DCC: Embo J, v. 20, p. 2715-22.

Llambi, F., F. C. Lourenco, D. Gozuacik, C. Guix, L. Pays, G. Del Rio, A. Kimchi, and P. Mehlen, 2005, The dependence receptor UNC5H2 mediates apoptosis through DAP-kinase: Embo J, v. 24, p. 1192-201.

Lomonosova, E., and G. Chinnadurai, 2008, BH3-only proteins in apoptosis and beyond: an overview: Oncogene, v. 27 Suppl 1, p. S2-19.

Lorenzo, H. K., S. A. Susin, J. Penninger, and G. Kroemer, 1999, Apoptosis inducing factor (AIF): a phylogenetically old, caspase-independent effector of cell death: Cell Death Differ, v. 6, p. 516-24.

Lotocki, G., O. F. Alonso, W. D. Dietrich, and R. W. Keane, 2004, Tumor necrosis factor receptor 1 and its signaling intermediates are recruited to lipid rafts in the traumatized brain: J Neurosci, v. 24, p. 11010-6.

Lourenco, F. C., V. Galvan, J. Fombonne, V. Corset, F. Llambi, U. Muller, D. E. Bredesen, and P. Mehlen, 2009, Netrin-1 interacts with amyloid precursor protein and regulates amyloid-beta production: Cell Death Differ.

Lovell, J. F., L. P. Billen, S. Bindner, A. Shamas-Din, C. Fradin, B. Leber, and D. W. Andrews, 2008, Membrane binding by tBid initiates an ordered series of events culminating in membrane permeabilization by Bax: Cell, v. 135, p. 1074-84.

Lowenfels, A. B., P. Maisonneuve, G. Cavallini, R. W. Ammann, P. G. Lankisch, J. R. Andersen, E. P. Dimagno, A. Andren-Sandberg, and L. Domellof, 1993, Pancreatitis and the risk of pancreatic cancer. International Pancreatitis Study Group: N Engl J Med, v. 328, p. 1433-7.

Ly, A., A. Nikolaev, G. Suresh, Y. Zheng, M. Tessier-Lavigne, and E. Stein, 2008, DSCAM is a netrin receptor that collaborates with DCC in mediating turning responses to netrin-1: Cell, v. 133, p. 1241-54.

Madeo, A., M. Vinciguerra, R. Lappano, M. Galgani, A. G. Campani, M. Maggiolini, and A. M. Musti, 2009, c-Jun activation is required for 4-hydroxytamoxifen-induced cell death in breast cancer cells: Oncogene.

Maisse, C., A. Rossin, N. Cahuzac, A. Paradisi, C. Klein, M. L. Haillot, Z. Herincs, P. Mehlen, and A. O. Hueber, 2008, Lipid raft localization and palmitoylation: identification of two requirements for cell death induction by the tumor suppressors UNC5H: Exp Cell Res, v. 314, p. 2544-52.

Mancini, M., and A. Toker, 2009, NFAT proteins: emerging roles in cancer progression: Nat Rev Cancer, v. 9, p. 810-20.

Manzl, C., G. Krumschnabel, F. Bock, B. Sohm, V. Labi, F. Baumgartner, E. Logette, J. Tschopp, and A. Villunger, 2009, Caspase-2 activation in the absence of PIDDosome formation: J Cell Biol, v. 185, p. 291-303.

Marini, P., D. Junginger, S. Stickl, W. Budach, M. Niyazi, and C. Belka, 2009, Combined treatment with lexatumumab and irradiation leads to strongly increased long term tumour control under normoxic and hypoxic conditions: Radiat Oncol, v. 4, p. 49.

Martin, M., P. Simon-Assmann, M. Kedinger, M. Martin, P. Mangeat, F. X. Real, and M. Fabre, 2006, DCC regulates cell adhesion in human colon cancer derived HT-29 cells and associates with ezrin: Eur J Cell Biol, v. 85, p. 769-83.

Matsunaga, E., S. Tauszig-Delamasure, P. P. Monnier, B. K. Mueller, S. M. Strittmatter, P. Mehlen, and A. Chedotal, 2004, RGM and its receptor neogenin regulate neuronal survival: Nat Cell Biol, v. 6, p. 749-55.

Mazelin, L., A. Bernet, C. Bonod-Bidaud, L. Pays, S. Arnaud, C. Gespach, D. E. Bredesen, J. Y. Scoazec, and P. Mehlen, 2004, Netrin-1 controls colorectal tumorigenesis by regulating apoptosis: Nature, v. 431, p. 80-4.

McKenna, W. L., C. Wong-Staal, G. C. Kim, H. Macias, L. Hinck, and J. L. Bartoe, 2008, Netrin-1-independent adenosine A2b receptor activation regulates the response of axons to netrin-1 by controlling cell surface levels of UNC5A receptors: J Neurochem, v. 104, p. 1081-90.

McKenzie, M. D., E. M. Carrington, T. Kaufmann, A. Strasser, D. C. Huang, T. W. Kay, J. Allison, and H. E. Thomas, 2008, Proapoptotic BH3-only protein Bid is essential for death receptor-induced apoptosis of pancreatic beta-cells: Diabetes, v. 57, p. 1284-92.

Mehlen, P., 2005, The dependence receptor notion: another way to see death: Cell Death Differ, v. 12, p. 1003.

Mehlen, P., and C. Furne, 2005, Netrin-1: when a neuronal guidance cue turns out to be a regulator of tumorigenesis: Cell Mol Life Sci, v. 62, p. 2599-616.

Mehlen, P., and C. Guenebeaud, 2009, Netrin-1 and its dependence receptors as original targets for cancer therapy: Curr Opin Oncol.

Mehlen, P., S. Rabizadeh, S. J. Snipas, N. Assa-Munt, G. S. Salvesen, and D. E. Bredesen, 1998, The DCC gene product induces apoptosis by a mechanism requiring receptor proteolysis: Nature, v. 395, p. 801-4.

Merino, D., N. Lalaoui, A. Morizot, P. Schneider, E. Solary, and O. Micheau, 2006, Differential inhibition of TRAIL-mediated DR5-DISC formation by decoy receptors 1 and 2: Mol Cell Biol, v. 26, p. 7046-55.

Micheau, O., M. Thome, P. Schneider, N. Holler, J. Tschopp, D. W. Nicholson, C. Briand, and M. G. Grutter, 2002, The long form of FLIP is an activator of caspase-8 at the Fas death-inducing signaling complex: J Biol Chem, v. 277, p. 45162-71.

Micheau, O., and J. Tschopp, 2003, Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes: Cell, v. 114, p. 181-90.

Migone, T. S., J. Zhang, X. Luo, L. Zhuang, C. Chen, B. Hu, J. S. Hong, J. W. Perry, S. F. Chen, J. X. Zhou, Y. H. Cho, S. Ullrich, P. Kanakaraj, J. Carrell, E. Boyd, H. S. Olsen, G. Hu, L. Pukac, D. Liu, J. Ni, S. Kim, R. Gentz, P. Feng, P. A. Moore, S. M. Ruben, and P. Wei, 2002, TL1A is a TNF-like ligand for DR3 and TR6/DcR3 and functions as a T cell costimulator: Immunity, v. 16, p. 479-92.

Mille F, G. C., Llambi F, Delloye-Bourgeois C, Guenebeaud C, Castro-Obregon S, Bredesen D, Thibert C, Mehlen P, 2009, Interfering with multimerization of netrin-1 receptors triggers tumor cell death: Cell Death Differ.

Mille, F., F. Llambi, C. Guix, C. Delloye-Bourgeois, C. Guenebeaud, S. Castro-Obregon, D. E. Bredesen, C. Thibert, and P. Mehlen, 2009a, Interfering with multimerization of netrin-1 receptors triggers tumor cell death: Cell Death Differ, v. 16, p. 1344-51.

Mille, F., C. Thibert, J. Fombonne, N. Rama, C. Guix, H. Hayashi, V. Corset, J. C. Reed, and P. Mehlen, 2009b, The Patched dependence receptor triggers apoptosis through a DRAL-caspase-9 complex: Nat Cell Biol, v. 11, p. 739-46.

Miller, K., M. Wang, J. Gralow, M. Dickler, M. Cobleigh, E. A. Perez, T. Shenkier, D. Cella, and N. E. Davidson, 2007, Paclitaxel plus bevacizumab versus paclitaxel alone for metastatic breast cancer: N Engl J Med, v. 357, p. 2666-76.

Mittag, F., D. Kuester, M. Vieth, B. Peters, B. Stolte, A. Roessner, and R. Schneider-Stock, 2006, DAPK promotor methylation is an early event in colorectal carcinogenesis: Cancer Lett, v. 240, p. 69-75.

Mourali, J., A. Benard, F. C. Lourenco, C. Monnet, C. Greenland, C. Moog-Lutz, C. Racaud-Sultan, D. Gonzalez-Dunia, M. Vigny, P. Mehlen, G. Delsol, and M. Allouche, 2006, Anaplastic lymphoma kinase is a dependence receptor whose proapoptotic functions are activated by caspase cleavage: Mol Cell Biol, v. 26, p. 6209-22.

Mumby, M., 2007, PP2A: unveiling a reluctant tumor suppressor: Cell, v. 130, p. 21-4.

Muramatsu, R., S. Nakahara, J. Ichikawa, K. Watanabe, N. Matsuki, and R. Koyama, 2009, The ratio of 'deleted in colorectal cancer' to 'uncoordinated-5A' netrin-1 receptors on the growth cone regulates mossy fibre directionality: Brain.

Nagata, S., 1996, Fas-induced apoptosis, and diseases caused by its abnormality: Genes Cells, v. 1, p. 873-9.

Nagata, Y., K. H. Lan, X. Zhou, M. Tan, F. J. Esteva, A. A. Sahin, K. S. Klos, P. Li, B. P. Monia, N. T. Nguyen, G. N. Hortobagyi, M. C. Hung, and D. Yu, 2004, PTEN activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of PTEN predicts trastuzumab resistance in patients: Cancer Cell, v. 6, p. 117-27.

Naumann, T., E. Casademunt, E. Hollerbach, J. Hofmann, G. Dechant, M. Frotscher, and Y. A. Barde, 2002, Complete deletion of the neurotrophin receptor p75NTR leads to long-lasting increases in the number of basal forebrain cholinergic neurons: J Neurosci, v. 22, p. 2409-18.

Navankasattusas, S., K. J. Whitehead, A. Suli, L. K. Sorensen, A. H. Lim, J. Zhao, K. W. Park, J. D. Wythe, K. R. Thomas, C. B. Chien, and D. Y. Li, 2008, The netrin receptor UNC5B promotes angiogenesis in specific vascular beds: Development, v. 135, p. 659-67.

Nguyen, A., and H. Cai, 2006, Netrin-1 induces angiogenesis via a DCC-dependent ERK1/2-eNOS feed-forward mechanism: Proc Natl Acad Sci U S A, v. 103, p. 6530-5.

Nikolaev, A., T. McLaughlin, D. D. O'Leary, and M. Tessier-Lavigne, 2009, APP binds DR6 to trigger axon pruning and neuron death via distinct caspases: Nature, v. 457, p. 981-9.

Nishiyama, M., A. Hoshino, L. Tsai, J. R. Henley, Y. Goshima, M. Tessier-Lavigne, M. M. Poo, and K. Hong, 2003, Cyclic AMP/GMP-dependent modulation of Ca2+ channels sets the polarity of nerve growth-cone turning: Nature, v. 423, p. 990-5.

O'Brien, S. M., D. F. Claxton, M. Crump, S. Faderl, T. Kipps, M. J. Keating, J. Viallet, and B. D. Cheson, 2009, Phase I study of obatoclax mesylate (GX15-070), a small molecule pan-Bcl-2 family antagonist, in patients with advanced chronic lymphocytic leukemia: Blood, v. 113, p. 299-305.

Olsson, M., H. Vakifahmetoglu, P. M. Abruzzo, K. Hogstrand, A. Grandien, and B. Zhivotovsky, 2009, DISC-mediated activation of caspase-2 in DNA damage-induced apoptosis: Oncogene, v. 28, p. 1949-59.

Ory, S., M. Zhou, T. P. Conrads, T. D. Veenstra, and D. K. Morrison, 2003, Protein phosphatase 2A positively regulates Ras signaling by dephosphorylating KSR1 and Raf-1 on critical 14-3-3 binding sites: Curr Biol, v. 13, p. 1356-64.

Paradisi, A., C. Maisse, A. Bernet, M. M. Coissieux, M. Maccarrone, J. Y. Scoazec, and P. Mehlen, 2008, NF-kappaB regulates netrin-1 expression and affects the conditional tumor suppressive activity of the netrin-1 receptors: Gastroenterology, v. 135, p. 1248-57.

Paradisi, A., C. Maisse, M. M. Coissieux, N. Gadot, F. Lepinasse, C. Delloye-Bourgeois, J. G. Delcros, M. Svrcek, C. Neufert, J. F. Flejou, J. Y. Scoazec, and P. Mehlen, 2009, Netrin-1 up-regulation in inflammatory bowel diseases is required for colorectal cancer progression: Proc Natl Acad Sci U S A, v. 106, p. 17146-51.

Park, K. W., D. Crouse, M. Lee, S. K. Karnik, L. K. Sorensen, K. J. Murphy, C. J. Kuo, and D. Y. Li, 2004a, The axonal attractant Netrin-1 is an angiogenic factor: Proc Natl Acad Sci U S A, v. 101, p. 16210-5.

Park, M. Y., H. D. Jang, S. Y. Lee, K. J. Lee, and E. Kim, 2004b, Fas-associated factor-1 inhibits nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) activity by interfering with nuclear translocation of the RelA (p65) subunit of NF-kappaB: J Biol Chem, v. 279, p. 2544-9.

Perrotta, C., C. De Palma, S. Falcone, C. Sciorati, and E. Clementi, 2005, Nitric oxide, ceramide and sphingomyelinase-coupled receptors: a tale of enzymes and messengers coordinating cell death, survival and differentiation: Life Sci, v. 77, p. 1732-9.

Peter, M. E., and P. H. Krammer, 2003, The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond: Cell Death Differ, v. 10, p. 26-35.

Picard, M., R. J. Petrie, J. Antoine-Bertrand, E. Saint-Cyr-Proulx, J. F. Villemure, and N. Lamarche-Vane, 2009, Spatial and temporal activation of the small GTPases RhoA and Rac1 by the netrin-1 receptor UNC5a during neurite outgrowth: Cell Signal, v. 21, p. 1961-73.

Pop, C., and G. S. Salvesen, 2009, Human caspases: activation, specificity, and regulation: J Biol Chem, v. 284, p. 21777-81.

Powell, A. W., T. Sassa, Y. Wu, M. Tessier-Lavigne, and F. Polleux, 2008, Topography of thalamic projections requires attractive and repulsive functions of Netrin-1 in the ventral telencephalon: PLoS Biol, v. 6, p. e116.

Pratt, M. R., M. D. Sekedat, K. P. Chiang, and T. W. Muir, 2009, Direct measurement of cathepsin B activity in the cytosol of apoptotic cells by an activity-based probe: Chem Biol, v. 16, p. 1001-12.

Pulling, L. C., M. J. Grimes, L. A. Damiani, D. E. Juri, K. Do, C. S. Tellez, and S. A. Belinsky, 2009, Dual promoter regulation of death-associated protein kinase gene leads to differentially silenced transcripts by methylation in cancer: Carcinogenesis, v. 30, p. 2023-30.

Rabizadeh, S., J. Oh, L. T. Zhong, J. Yang, C. M. Bitler, L. L. Butcher, and D. E. Bredesen, 1993, Induction of apoptosis by the low-affinity NGF receptor: Science, v. 261, p. 345-8.

Rahnama, F., T. Shimokawa, M. Lauth, C. Finta, P. Kogerman, S. Teglund, R. Toftgard, and P. G. Zaphiropoulos, 2006, Inhibition of GLI1 gene activation by Patched1: Biochem J, v. 394, p. 19-26.

Rajasekharan, S., K. A. Baker, K. E. Horn, A. A. Jarjour, J. P. Antel, and T. E. Kennedy, 2009, Netrin 1 and Dcc regulate oligodendrocyte process branching and membrane extension via Fyn and RhoA: Development, v. 136, p. 415-26.

Raveh, T., G. Droguett, M. S. Horwitz, R. A. DePinho, and A. Kimchi, 2001, DAP kinase activates a p19ARF/p53-mediated apoptotic checkpoint to suppress oncogenic transformation: Nat Cell Biol, v. 3, p. 1-7.

Ren, X. R., Y. Hong, Z. Feng, H. M. Yang, L. Mei, and W. C. Xiong, 2008, Tyrosine phosphorylation of netrin receptors in netrin-1 signaling: Neurosignals, v. 16, p. 235-45.

Ren, X. R., G. L. Ming, Y. Xie, Y. Hong, D. M. Sun, Z. Q. Zhao, Z. Feng, Q. Wang, S. Shim, Z. F. Chen, H. J. Song, L. Mei, and W. C. Xiong, 2004, Focal adhesion kinase in netrin-1 signaling: Nat Neurosci, v. 7, p. 1204-12.

Ribeil, J. A., Y. Zermati, J. Vandekerckhove, S. Cathelin, J. Kersual, M. Dussiot, S. Coulon, I. C. Moura, A. Zeuner, T. Kirkegaard-Sorensen, B. Varet, E. Solary, C. Garrido, and O. Hermine, 2007, Hsp70 regulates erythropoiesis by preventing caspase-3-mediated cleavage of GATA-1: Nature, v. 445, p. 102-5.

Rosenberger, P., J. M. Schwab, V. Mirakaj, E. Masekowsky, A. Mager, J. C. Morote-Garcia, K. Unertl, and H. K. Eltzschig, 2009, Hypoxia-inducible factor-dependent induction of netrin-1 dampens inflammation caused by hypoxia: Nat Immunol, v. 10, p. 195-202.

Rossin, A., M. Derouet, F. Abdel-Sater, and A. O. Hueber, 2009, Palmitoylation of the TRAIL receptor DR4 confers an efficient TRAIL-induced cell death signalling: Biochem J, v. 419, p. 185-92, 2 p following 192.

Ryu, S. W., S. J. Lee, M. Y. Park, J. I. Jun, Y. K. Jung, and E. Kim, 2003, Fas-associated factor 1, FAF1, is a member of Fas death-inducing signaling complex: J Biol Chem, v. 278, p. 24003-10.

Sablina, A. A., W. Chen, J. D. Arroyo, L. Corral, M. Hector, S. E. Bulmer, J. A. DeCaprio, and W. C. Hahn, 2007, The tumor suppressor PP2A Abeta regulates the RalA GTPase: Cell, v. 129, p. 969-82.

Salehi, A. H., P. P. Roux, C. J. Kubu, C. Zeindler, A. Bhakar, L. L. Tannis, J. M. Verdi, and P. A. Barker, 2000, NRAGE, a novel MAGE protein, interacts with the p75 neurotrophin receptor and facilitates nerve growth factor-dependent apoptosis: Neuron, v. 27, p. 279-88.

Salehi, A. H., S. Xanthoudakis, and P. A. Barker, 2002, NRAGE, a p75 neurotrophin receptor-interacting protein, induces caspase activation and cell death through a JNK-dependent mitochondrial pathway: J Biol Chem, v. 277, p. 48043-50.

Salminen, M., B. I. Meyer, E. Bober, and P. Gruss, 2000, Netrin 1 is required for semicircular canal formation in the mouse inner ear: Development, v. 127, p. 13-22.

Salvesen, G. S., and C. S. Duckett, 2002, IAP proteins: blocking the road to death's door: Nat Rev Mol Cell Biol, v. 3, p. 401-10.

Sanlioglu, A. D., B. Karacay, I. T. Koksal, T. S. Griffith, and S. Sanlioglu, 2007, DcR2 (TRAIL-R4) siRNA and adenovirus delivery of TRAIL (Ad5hTRAIL) break down in vitro tumorigenic potential of prostate carcinoma cells: Cancer Gene Ther, v. 14, p. 976-84.

Scaffidi, C., S. Fulda, A. Srinivasan, C. Friesen, F. Li, K. J. Tomaselli, K. M. Debatin, P. H. Krammer, and M. E. Peter, 1998, Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways: Embo J, v. 17, p. 1675-87.

Schimmer, A. D., S. O'Brien, H. Kantarjian, J. Brandwein, B. D. Cheson, M. D. Minden, K. Yee, F. Ravandi, F. Giles, A. Schuh, V. Gupta, M. Andreeff, C. Koller, H. Chang, S. Kamel-Reid, M. Berger, J. Viallet, and G. Borthakur, 2008, A phase I study of the pan bcl-2 family inhibitor obatoclax mesylate in patients with advanced hematologic malignancies: Clin Cancer Res, v. 14, p. 8295-301.

Schraven, B., and M. E. Peter, 1995, APO-1(CD95)-mediated apoptosis in Jurkat cells does not involve src kinases or CD45: FEBS Lett, v. 368, p. 491-4.

Schubert, T., S. Kaufmann, A. K. Wenke, S. Grassel, and A. K. Bosserhoff, 2009, Role of deleted in colon carcinoma in osteoarthritis and in chondrocyte migration: Rheumatology (Oxford), v. 48, p. 1435-41.

Schulte, M., K. Reiss, M. Lettau, T. Maretzky, A. Ludwig, D. Hartmann, B. de Strooper, O. Janssen, and P. Saftig, 2007, ADAM10 regulates FasL cell surface expression and modulates FasL-induced cytotoxicity and activation-induced cell death: Cell Death Differ, v. 14, p. 1040-9.

Sedel, F., C. Bechade, and A. Triller, 1999, Nerve growth factor (NGF) induces motoneuron apoptosis in rat embryonic spinal cord in vitro: Eur J Neurosci, v. 11, p. 3904-12.

Serafini, T., S. A. Colamarino, E. D. Leonardo, H. Wang, R. Beddington, W. C. Skarnes, and M. Tessier-Lavigne, 1996, Netrin-1 is required for commissural axon guidance in the developing vertebrate nervous system: Cell, v. 87, p. 1001-14.

Serafini, T., T. E. Kennedy, M. J. Galko, C. Mirzayan, T. M. Jessell, and M. Tessier-Lavigne, 1994, The netrins define a family of axon outgrowth-promoting proteins homologous to C. elegans UNC-6: Cell, v. 78, p. 409-24.

Sheikh, M. S., Y. Huang, E. A. Fernandez-Salas, W. S. El-Deiry, H. Friess, S. Amundson, J. Yin, S. J. Meltzer, N. J. Holbrook, and A. J. Fornace, Jr., 1999, The antiapoptotic decoy receptor TRID/TRAIL-R3 is a p53-regulated DNA damage-inducible gene that is overexpressed in primary tumors of the gastrointestinal tract: Oncogene, v. 18, p. 4153-9.

Shekarabi, M., S. W. Moore, N. X. Tritsch, S. J. Morris, J. F. Bouchard, and T. E. Kennedy, 2005, Deleted in colorectal cancer binding netrin-1 mediates cell substrate adhesion and recruits Cdc42, Rac1, Pak1, and N-WASP into an intracellular signaling complex that promotes growth cone expansion: J Neurosci, v. 25, p. 3132-41.

Sheridan, J. P., S. A. Marsters, R. M. Pitti, A. Gurney, M. Skubatch, D. Baldwin, L. Ramakrishnan, C. L. Gray, K. Baker, W. I. Wood, A. D. Goddard, P. Godowski, and A. Ashkenazi, 1997, Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors: Science, v. 277, p. 818-21.

Shi, M., C. J. Vivian, K. J. Lee, C. Ge, K. Morotomi-Yano, C. Manzl, F. Bock, S. Sato, C. Tomomori-Sato, R. Zhu, J. S. Haug, S. K. Swanson, M. P. Washburn, D. J. Chen, B. P. Chen, A. Villunger, L. Florens, and C. Du, 2009, DNA-PKcs-PIDDosome: a nuclear caspase-2-activating complex with role in G2/M checkpoint maintenance: Cell, v. 136, p. 508-20.

Shibue, T., S. Suzuki, H. Okamoto, H. Yoshida, Y. Ohba, A. Takaoka, and T. Taniguchi, 2006, Differential contribution of Puma and Noxa in dual regulation of p53-mediated apoptotic pathways: Embo J, v. 25, p. 4952-62.

Shimazu, T., K. Degenhardt, E. K. A. Nur, J. Zhang, T. Yoshida, Y. Zhang, R. Mathew, E. White, and M. Inouye, 2007, NBK/BIK antagonizes MCL-1 and BCL-XL and activates BAK-mediated apoptosis in response to protein synthesis inhibition: Genes Dev, v. 21, p. 929-41.

Shin, S., B. J. Sung, Y. S. Cho, H. J. Kim, N. C. Ha, J. I. Hwang, C. W. Chung, Y. K. Jung, and B. H. Oh, 2001, An anti-apoptotic protein human survivin is a direct inhibitor of caspase-3 and -7: Biochemistry, v. 40, p. 1117-23.

Shin, S. K., T. Nagasaka, B. H. Jung, N. Matsubara, W. H. Kim, J. M. Carethers, C. R. Boland, and A. Goel, 2007, Epigenetic and genetic alterations in Netrin-1 receptors UNC5C and DCC in human colon cancer: Gastroenterology, v. 133, p. 1849-57.

Shohat, G., G. Shani, M. Eisenstein, and A. Kimchi, 2002a, The DAP-kinase family of proteins: study of a novel group of calcium-regulated death-promoting kinases: Biochim Biophys Acta, v. 1600, p. 45-50.

Shohat, G., T. Spivak-Kroizman, M. Eisenstein, and A. Kimchi, 2002b, The regulation of death-associated protein (DAP) kinase in apoptosis: Eur Cytokine Netw, v. 13, p. 398-400.

Shu, H. B., D. R. Halpin, and D. V. Goeddel, 1997, Casper is a FADD- and caspase-related inducer of apoptosis: Immunity, v. 6, p. 751-63.

Singh, R. K., T. S. Lange, K. K. Kim, and L. Brard, 2009, A coumarin derivative (RKS262) inhibits cell-cycle progression, causes pro-apoptotic signaling and cytotoxicity in ovarian cancer cells: Invest New Drugs.

Snyder, C. M., E. H. Shroff, J. Liu, and N. S. Chandel, 2009, Nitric oxide induces cell death by regulating anti-apoptotic BCL-2 family members: PLoS One, v. 4, p. e7059.

Srinivasan, K., P. Strickland, A. Valdes, G. C. Shin, and L. Hinck, 2003, Netrin-1/neogenin interaction stabilizes multipotent progenitor cap cells during mammary gland morphogenesis: Dev Cell, v. 4, p. 371-82.

Srinivasula, S. M., R. Hegde, A. Saleh, P. Datta, E. Shiozaki, J. Chai, R. A. Lee, P. D. Robbins, T. Fernandes-Alnemri, Y. Shi, and E. S. Alnemri, 2001, A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis: Nature, v. 410, p. 112-6.

Stanco, A., C. Szekeres, N. Patel, S. Rao, K. Campbell, J. A. Kreidberg, F. Polleux, and E. S. Anton, 2009, Netrin-1-alpha3beta1 integrin interactions regulate the migration of interneurons through the cortical marginal zone: Proc Natl Acad Sci U S A, v. 106, p. 7595-600.

Stapleton, D., I. Balan, T. Pawson, and F. Sicheri, 1999, The crystal structure of an Eph receptor SAM domain reveals a mechanism for modular dimerization: Nat Struct Biol, v. 6, p. 44-9.

Stein, E., and M. Tessier-Lavigne, 2001, Hierarchical organization of guidance receptors: silencing of netrin attraction by slit through a Robo/DCC receptor complex: Science, v. 291, p. 1928-38.

Steinle, A. U., H. Weidenbach, M. Wagner, G. Adler, and R. M. Schmid, 1999, NF-kappaB/Rel activation in cerulein pancreatitis: Gastroenterology, v. 116, p. 420-30.

Strasser, A., P. J. Jost, and S. Nagata, 2009, The many roles of FAS receptor signaling in the immune system: Immunity, v. 30, p. 180-92.

Stupack, D. G., X. S. Puente, S. Boutsaboualoy, C. M. Storgard, and D. A. Cheresh, 2001, Apoptosis of adherent cells by recruitment of caspase-8 to unligated integrins: J Cell Biol, v. 155, p. 459-70.

Susin, S. A., H. K. Lorenzo, N. Zamzami, I. Marzo, B. E. Snow, G. M. Brothers, J. Mangion, E. Jacotot, P. Costantini, M. Loeffler, N. Larochette, D. R. Goodlett, R. Aebersold, D. P. Siderovski, J. M. Penninger, and G. Kroemer, 1999, Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor: Nature, v. 397, p. 441-6.

Suzuki, K., S. Hata, Y. Kawabata, and H. Sorimachi, 2004, Structure, activation, and biology of calpain: Diabetes, v. 53 Suppl 1, p. S12-8.

Suzuki, Y., Y. Imai, H. Nakayama, K. Takahashi, K. Takio, and R. Takahashi, 2001, A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death: Mol Cell, v. 8, p. 613-21.

Tait, S. W., and D. R. Green, 2008, Caspase-independent cell death: leaving the set without the final cut: Oncogene, v. 27, p. 6452-61.

Tamaki, M., T. Goi, Y. Hirono, K. Katayama, and A. Yamaguchi, 2004, PPP2R1B gene alterations inhibit interaction of PP2A-Abeta and PP2A-C proteins in colorectal cancers: Oncol Rep, v. 11, p. 655-9.

Tan, M. L., J. P. Ooi, N. Ismail, A. I. Moad, and T. S. Muhammad, 2009, Programmed cell death pathways and current antitumor targets: Pharm Res, v. 26, p. 1547-60.

Tang, X., S. W. Jang, M. Okada, C. B. Chan, Y. Feng, Y. Liu, S. W. Luo, Y. Hong, N. Rama, W. C. Xiong, P. Mehlen, and K. Ye, 2008, Netrin-1 mediates neuronal survival through PIKE-L interaction with the dependence receptor UNC5B: Nat Cell Biol, v. 10, p. 698-706.

Tanikawa, C., K. Matsuda, S. Fukuda, Y. Nakamura, and H. Arakawa, 2003, p53RDL1 regulates p53-dependent apoptosis: Nat Cell Biol, v. 5, p. 216-23.

Tauszig-Delamasure, S., L. Y. Yu, J. R. Cabrera, J. Bouzas-Rodriguez, C. Mermet-Bouvier, C. Guix, M. C. Bordeaux, U. Arumae, and P. Mehlen, 2007, The TrkC receptor induces apoptosis when the dependence receptor notion meets the neurotrophin paradigm: Proc Natl Acad Sci U S A, v. 104, p. 13361-6.

Teitz, T., T. Wei, M. B. Valentine, E. F. Vanin, J. Grenet, V. A. Valentine, F. G. Behm, A. T. Look, J. M. Lahti, and V. J. Kidd, 2000, Caspase 8 is deleted or silenced preferentially in childhood neuroblastomas with amplification of MYCN: Nat Med, v. 6, p. 529-35.

Temkin, V., Q. Huang, H. Liu, H. Osada, and R. M. Pope, 2006, Inhibition of ADP/ATP exchange in receptor-interacting protein-mediated necrosis: Mol Cell Biol, v. 26, p. 2215-25.

Thiagalingam, S., C. Lengauer, F. S. Leach, M. Schutte, S. A. Hahn, J. Overhauser, J. K. Willson, S. Markowitz, S. R. Hamilton, S. E. Kern, K. W. Kinzler, and B. Vogelstein, 1996, Evaluation of candidate tumour suppressor genes on chromosome 18 in colorectal cancers: Nat Genet, v. 13, p. 343-6.

Thibert, C., M. A. Teillet, F. Lapointe, L. Mazelin, N. M. Le Douarin, and P. Mehlen, 2003, Inhibition of neuroepithelial patched-induced apoptosis by sonic hedgehog: Science, v. 301, p. 843-6.

Thiebault, K., L. Mazelin, L. Pays, F. Llambi, M. O. Joly, J. Y. Scoazec, J. C. Saurin, G. Romeo, and P. Mehlen, 2003, The netrin-1 receptors UNC5H are putative tumor suppressors controlling cell death commitment: Proc Natl Acad Sci U S A, v. 100, p. 4173-8.

Tinel, A., and J. Tschopp, 2004, The PIDDosome, a protein complex implicated in activation of caspase-2 in response to genotoxic stress: Science, v. 304, p. 843-6.

Tulasne, D., J. Deheuninck, F. C. Lourenco, F. Lamballe, Z. Ji, C. Leroy, E. Puchois, A. Moumen, F. Maina, P. Mehlen, and V. Fafeur, 2004, Proapoptotic function of the MET tyrosine kinase receptor through caspase cleavage: Mol Cell Biol, v. 24, p. 10328-39.

Vande Walle, L., P. Van Damme, M. Lamkanfi, X. Saelens, J. Vandekerckhove, K. Gevaert, and P. Vandenabeele, 2007, Proteome-wide Identification of HtrA2/Omi Substrates: J Proteome Res, v. 6, p. 1006-15.

Verhagen, A. M., P. G. Ekert, M. Pakusch, J. Silke, L. M. Connolly, G. E. Reid, R. L. Moritz, R. J. Simpson, and D. L. Vaux, 2000, Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins: Cell, v. 102, p. 43-53.

Vogler, M., H. Walczak, D. Stadel, T. L. Haas, F. Genze, M. Jovanovic, J. E. Gschwend, T. Simmet, K. M. Debatin, and S. Fulda, 2008, Targeting XIAP bypasses Bcl-2-mediated resistance to TRAIL and cooperates with TRAIL to suppress pancreatic cancer growth in vitro and in vivo: Cancer Res, v. 68, p. 7956-65.

Wajant, H., 2003, Death receptors: Essays Biochem, v. 39, p. 53-71.

Wang, H., T. Ozaki, M. Shamim Hossain, Y. Nakamura, T. Kamijo, X. Xue, and A. Nakagawara, 2008, A newly identified dependence receptor UNC5H4 is induced during DNA damage-mediated apoptosis and transcriptional target of tumor suppressor p53: Biochem Biophys Res Commun, v. 370, p. 594-8.

Wang, R., Z. Wei, H. Jin, H. Wu, C. Yu, W. Wen, L. N. Chan, Z. Wen, and M. Zhang, 2009a, Autoinhibition of UNC5b revealed by the cytoplasmic domain structure of the receptor: Mol Cell, v. 33, p. 692-703.

Wang, S. S., E. D. Esplin, J. L. Li, L. Huang, A. Gazdar, J. Minna, and G. A. Evans, 1998, Alterations of the PPP2R1B gene in human lung and colon cancer: Science, v. 282, p. 284-7.

Wang, W., W. B. Reeves, L. Pays, P. Mehlen, and G. Ramesh, 2009b, Netrin-1 overexpression protects kidney from ischemia reperfusion injury by suppressing apoptosis: Am J Pathol, v. 175, p. 1010-8.

Wang, W., W. B. Reeves, and G. Ramesh, 2009c, Netrin-1 increases proliferation and migration of renal proximal tubular epithelial cells via the UNC5B receptor: Am J Physiol Renal Physiol, v. 296, p. F723-9.

Warburton, D., M. Schwarz, D. Tefft, G. Flores-Delgado, K. D. Anderson, and W. V. Cardoso, 2000, The molecular basis of lung morphogenesis: Mech Dev, v. 92, p. 55-81.

Wiese, S., F. Metzger, B. Holtmann, and M. Sendtner, 1999, The role of p75NTR in modulating neurotrophin survival effects in developing motoneurons: Eur J Neurosci, v. 11, p. 1668-76.

Wiley, S. R., K. Schooley, P. J. Smolak, W. S. Din, C. P. Huang, J. K. Nicholl, G. R. Sutherland, T. D. Smith, C. Rauch, C. A. Smith, and et al., 1995, Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis: Immunity, v. 3, p. 673-82.

Williams, M. E., P. Strickland, K. Watanabe, and L. Hinck, 2003a, UNC5H1 induces apoptosis via its juxtamembrane region through an interaction with NRAGE: J Biol Chem, v. 278, p. 17483-90.

Williams, M. E., S. C. Wu, W. L. McKenna, and L. Hinck, 2003b, Surface expression of the netrin receptor UNC5H1 is regulated through a protein kinase C-interacting protein/protein kinase-dependent mechanism: J Neurosci, v. 23, p. 11279-88.

Wilson, D. J., K. A. Fortner, D. H. Lynch, R. R. Mattingly, I. G. Macara, J. A. Posada, and R. C. Budd, 1996, JNK, but not MAPK, activation is associated with Fas-mediated apoptosis in human T cells: Eur J Immunol, v. 26, p. 989-94.

Wilson, N. H., and B. Key, 2006, Neogenin interacts with RGMa and netrin-1 to guide axons within the embryonic vertebrate forebrain: Dev Biol, v. 296, p. 485-98.

Wolf, B. B., M. Schuler, W. Li, B. Eggers-Sedlet, W. Lee, P. Tailor, P. Fitzgerald, G. B. Mills, and D. R. Green, 2001, Defective cytochrome c-dependent caspase activation in ovarian cancer cell lines due to diminished or absent apoptotic protease activating factor-1 activity: J Biol Chem, v. 276, p. 34244-51.

Wu, G., J. Chai, T. L. Suber, J. W. Wu, C. Du, X. Wang, and Y. Shi, 2000, Structural basis of IAP recognition by Smac/DIABLO: Nature, v. 408, p. 1008-12.

Wu, L., J. A. Bernard-Trifilo, Y. Lim, S. T. Lim, S. K. Mitra, S. Uryu, M. Chen, C. J. Pallen, N. K. Cheung, D. Mikolon, A. Mielgo, D. G. Stupack, and D. D. Schlaepfer, 2008, Distinct FAK-Src activation events promote alpha5beta1 and alpha4beta1 integrin-stimulated neuroblastoma cell motility: Oncogene, v. 27, p. 1439-48.

Xue, D., and H. R. Horvitz, 1995, Inhibition of the Caenorhabditis elegans cell-death protease CED-3 by a CED-3 cleavage site in baculovirus p35 protein: Nature, v. 377, p. 248-51.

Yakovlev, A. G., S. Di Giovanni, G. Wang, W. Liu, B. Stoica, and A. I. Faden, 2004, BOK and NOXA are essential mediators of p53-dependent apoptosis: J Biol Chem, v. 279, p. 28367-74.

Yang, C. R., S. L. Hsieh, C. M. Teng, F. M. Ho, W. L. Su, and W. W. Lin, 2004, Soluble decoy receptor 3 induces angiogenesis by neutralization of TL1A, a cytokine belonging to tumor necrosis factor superfamily and exhibiting angiostatic action: Cancer Res, v. 64, p. 1122-9.

Yang, H. L., T. Eriksson, E. Vernersson, M. Vigny, B. Hallberg, and R. H. Palmer, 2007a, The ligand Jelly Belly (Jeb) activates the Drosophila Alk RTK to drive PC12 cell differentiation, but is unable to activate the mouse ALK RTK: J Exp Zool B Mol Dev Evol, v. 308, p. 269-82.

Yang, J., G. H. Fan, B. E. Wadzinski, H. Sakurai, and A. Richmond, 2001, Protein phosphatase 2A interacts with and directly dephosphorylates RelA: J Biol Chem, v. 276, p. 47828-33.

Yang, Y., L. Zou, Y. Wang, K. S. Xu, J. X. Zhang, and J. H. Zhang, 2007b, Axon guidance cue Netrin-1 has dual function in angiogenesis: Cancer Biol Ther, v. 6, p. 743-8.

Yebra, M., A. M. Montgomery, G. R. Diaferia, T. Kaido, S. Silletti, B. Perez, M. L. Just, S. Hildbrand, R. Hurford, E. Florkiewicz, M. Tessier-Lavigne, and V. Cirulli, 2003, Recognition of the neural chemoattractant Netrin-1 by integrins alpha6beta4 and alpha3beta1 regulates epithelial cell adhesion and migration: Dev Cell, v. 5, p. 695-707.

Yeh, L. S., Y. Y. Hsieh, J. G. Chang, W. W. Chang, C. C. Chang, and F. J. Tsai, 2007, Mutation analysis of the tumor suppressor gene PPP2R1B in human cervical cancer: Int J Gynecol Cancer, v. 17, p. 868-71.

Yeo, T. T., J. Chua-Couzens, L. L. Butcher, D. E. Bredesen, J. D. Cooper, J. S. Valletta, W. C. Mobley, and F. M. Longo, 1997, Absence of p75NTR causes increased basal forebrain cholinergic neuron size, choline acetyltransferase activity, and target innervation: J Neurosci, v. 17, p. 7594-605.

Yin, X. M., K. Wang, A. Gross, Y. Zhao, S. Zinkel, B. Klocke, K. A. Roth, and S. J. Korsmeyer, 1999, Bid-deficient mice are resistant to Fas-induced hepatocellular apoptosis: Nature, v. 400, p. 886-91.

Yoshida, H., Y. Y. Kong, R. Yoshida, A. J. Elia, A. Hakem, R. Hakem, J. M. Penninger, and T. W. Mak, 1998, Apaf1 is required for mitochondrial pathways of apoptosis and brain development: Cell, v. 94, p. 739-50.

Young, J. E., G. A. Garden, R. A. Martinez, F. Tanaka, C. M. Sandoval, A. C. Smith, B. L. Sopher, A. Lin, K. H. Fischbeck, L. M. Ellerby, R. S. Morrison, J. P. Taylor, and A. R. La Spada, 2009, Polyglutamine-expanded androgen receptor truncation fragments activate a Bax-dependent apoptotic cascade mediated by DP5/Hrk: J Neurosci, v. 29, p. 1987-97.

Yu, J. W., P. D. Jeffrey, and Y. Shi, 2009, Mechanism of procaspase-8 activation by c-FLIPL: Proc Natl Acad Sci U S A, v. 106, p. 8169-74.

Yu, J. W., and Y. Shi, 2008, FLIP and the death effector domain family: Oncogene, v. 27, p. 6216-27.

Yu, X., D. Acehan, J. F. Menetret, C. R. Booth, S. J. Ludtke, S. J. Riedl, Y. Shi, X. Wang, and C. W. Akey, 2005, A structure of the human apoptosome at 12.8 A resolution provides insights into this cell death platform: Structure, v. 13, p. 1725-35.

Zermati, Y., C. Garrido, S. Amsellem, S. Fishelson, D. Bouscary, F. Valensi, B. Varet, E. Solary, and O. Hermine, 2001, Caspase activation is required for terminal erythroid differentiation: J Exp Med, v. 193, p. 247-54.

Zerp, S. F., R. Stoter, G. Kuipers, D. Yang, M. E. Lippman, W. J. van Blitterswijk, H. Bartelink, R. Rooswinkel, V. Lafleur, and M. Verheij, 2009, AT-101, a small molecule inhibitor of anti-apoptotic Bcl-2 family members, activates the SAPK/JNK pathway and enhances radiation-induced apoptosis: Radiat Oncol, v. 4, p. 47.

Zhang, L., and B. Fang, 2005, Mechanisms of resistance to TRAIL-induced apoptosis in cancer: Cancer Gene Ther, v. 12, p. 228-37.

Zhang, Y., and B. Zhang, 2008, TRAIL resistance of breast cancer cells is associated with constitutive endocytosis of death receptors 4 and 5: Mol Cancer Res, v. 6, p. 1861-71.

Annexe I : Revue

Patrick Mehlen and Céline Guenebeaud,

Current Opinion in Oncology, acceptée en 2009

Netrin-1 and its dependence receptors as original targets for cancer therapy

Netrin-1 and its dependence receptors as original targets for cancer therapy

Patrick Mehlen and Céline Guenebeaud

Apoptosis, Cancer and Development Laboratory, Equipe labellisée 'La Ligue', CNRS UMR5238, Université de Lyon, Centre Léon Bérard, Lyon, France

Correspondence to Patrick Mehlen, Apoptosis, Cancer and Development Laboratory, Equipe labellisée 'La Ligue', CNRS UMR5238, Université de Lyon, Centre Léon Bérard, 69008 Lyon, France
Tel: +33 478785128; e-mail: mehlen@lyon.fnclcc.fr

Current Opinion in Oncology 2010, 22:46–54

Purpose of review

The dependence receptor notion has recently seen an interesting development. From a basic cell biology concept, which proposes that some transmembrane receptors can be active in the absence of their ligand and induce in the setting apoptosis, recent observations have provided new hope for the development of alternative targeted therapies. The purpose of this review is to show, with the example of netrin-1 dependence receptors, the path from cell biology to promising anticancer-targeted therapy.

Recent findings

The dependence receptors Deleted in Colorectal Cancer and Unc-5 homolog that bind netrin-1 had been implicated in nervous system development as they participate in neuronal navigation. They were also implicated beyond the developing brain with roles in angiogenesis regulation and homeostasis of various tissues. However, these receptors were shown to trigger apoptosis in the absence of netrin-1 and, as such, act as tumor suppressors. Recent data support the view that Deleted in Colorectal Cancer/Unc-5 homolog proapoptotic signals are indeed a safeguard mechanism regulating tumor growth and metastasis.

Summary

In this review, we will develop the different data supporting the view that a selective advantage for a tumor is to inactivate this dependence receptor's proapoptotic signal and will describe a putative therapeutic approach that is to reactivate this death signaling in tumor cells.

Keywords

apoptosis, cancer, dependence receptor, netrin-1, targeted therapy

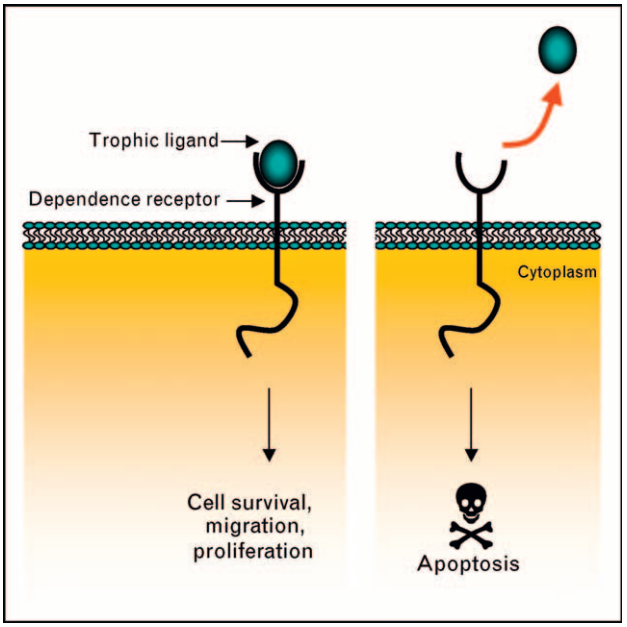
Curr Opin Oncol 22:46–54
© 2010 Wolters Kluwer Health | Lippincott Williams & Wilkins
1040-8746

Introduction

It has been known for over half a century that cells depend on stimulation for their survival. Stimulation is mediated by various receptors and sensors. For example, cells may require specific soluble trophic factors, cytokines, hormones, extracellular matrix interactions, cell–cell interactions, or electrical activity for survival. For any given required stimulus, withdrawal leads to programmed cell death or apoptosis. It has generally been assumed that cell death induced by withdrawal of supporting factors is due to the loss of the associated positive survival signals such as Akt phosphorylation. Although such survival signals are clearly very important, data obtained over the past 10 years argue for a complementary and novel form of signal transduction that actively induces cell death following stimulus withdrawal. This 'negative signal transduction' is mediated by specific 'dependence receptors' that induce apoptosis in the absence of the required stimulus (e.g., when unbound by a trophic ligand), but block cell death in the presence of the required stimulus (e.g., when bound by a trophic ligand) (Fig. 1). Thus, the expression of various dependence receptors creates a state of dependence to their respective ligands. To date, more than a dozen of such receptors have been identified: the nerve growth factor receptor $p75^{NTR}$, RET (rearranged during transfection), TrkC, ALK, EPHA4, neogenin, some integrins, the Sonic Hedgehog receptor Patched (Ptc), and the netrin-1 receptors DCC (Deleted in Colorectal Cancer) and UNC5H1–4 (Unc-5 homolog 1–4). As detailed in different reviews on dependence receptors, the proapoptotic activity of these receptors has been implicated in both developmental processes and in cancer regulation [1–3]. We will concentrate this short review on the prototypical netrin-1 receptors (Fig. 2), as they represent the most studied example of dependence receptors and on their implication in cancer regulation.

Netrin-1 is a laminin-related molecule initially discovered as a diffusible molecule produced by a ventral structure in the developing spinal cord, that is, floor plate, that attracts commissural axons [4]. Netrin-1 is a member

Figure 1 The dependence receptor notion



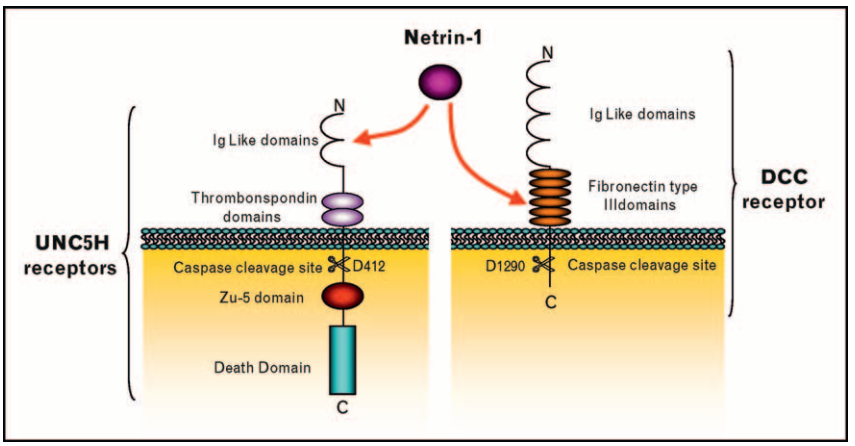
Although the classic view of transmembrane receptors supports that they are inactive in the absence of ligand, dependence receptors are active when unbound and induce apoptosis.

of a family of homologous molecules, which include netrin-3, netrin-G1, netrin-G2, and netrin-4/b-netrin but the main attention has been focused on netrin-1 rather than on its other homologs. One reason for this interest is the dramatic phenotype of the netrin-1 mutant mice, which show major developmental defects in the nervous system [5,6]. Netrin-1 was shown to act as a chemoattractive or chemorepulsive cue for many migrating axons and neurons. This effect is believed to occur through the binding to two main families of type 1 transmembrane receptors: DCC (for deleted in colorectal cancer) and its homolog neogenin and the UNC5H, that is, UNC5 homolog receptors (UNC5H1, UNC5H2, UNC5H3, and UNC5H4, also called UNC5A, UNC5B, UNC5C, and UNC5D) (Fig. 2). However, recent data support the implication of netrin-1 and its main receptors beyond the brain.

Along this line, netrin-1 and its receptors are also expressed in nonneural tissues such as pancreas [7,8], mammary gland [9], or lung [10] that has suggested their role in the morphogenesis of 'branched' organs. Furthermore, the interaction of netrin-1/receptors and, more specifically, netrin-1/UNC5H2, was recently shown to be involved in the morphogenesis of endothelial vessels, but the precise nature of this involvement is not yet clearly established. Indeed, although it is clearly shown that UNC5H2 expressed by the tip cells is a key player in developmental angiogenesis [11], the present data published either suggest an antiangiogenic role or a proangiogenic role for netrin-1 [11–13].

In adults, the functions of the netrin-1/receptors are difficult to study, especially because of the perinatal lethality of transgenic animals deficient for the genes encoding netrin-1 and its receptors. It appears, however, that the expression of netrin-1 and its receptors is relatively ubiquitous. Specifically because of their expression in many cell types of the adult nervous system, netrin-1 and its receptors could be implicated in cell–cell interaction and axonal regeneration [14]. A recent study [15] also argues for a role of netrin-1 in autoimmune diseases and in the inflammatory reactions associated to these diseases.

Figure 2 Netrin-1 and its receptors



DCC and UNC5H are type I transmembrane receptors that interact with netrin-1. The different domains in DCC and UNC5H are indicated. These receptors bind netrin-1 on the two immunoglobulin-like domains (UNC5H) and on the 4–5th fibronectin type III domains (DCC). Their intracellular domain is essential for cell death induction and particularly the caspases cleavage site located at D412 (UNC5H) and D1290 (DCC). DCC, Deleted in Colorectal Cancer; Ig, immunoglobulin; UNC5H, Unc-5 homolog.

Netrin-1 receptors as prototypical dependence receptors

Although netrin-1 and its receptors were clearly identified as key mediators of nervous system development, the netrin-1 receptor DCC, as illustrated by its name Deleted in Colorectal Cancer, was, on the contrary, first identified as a candidate tumor suppressor rather than as a mediator of axon guidance. The *DCC* gene is deleted through allelic loss in the majority of colorectal cancers [16]. The observation that *DCC* expression is lost or reduced in colorectal cancers suggests that DCC expression somehow represents a constraint for tumor development. Such receptor bifunctionality – mediation of neuron/axon migration during development, and putative tumor suppression in various cancers – has proven to be a common theme for dependence receptors. Along this line, it was shown that DCC expression in various cell lines lacking endogenous DCC expression leads to cell death induction [17,18]. Moreover, addition of the DCC ligand, netrin-1, was shown to be sufficient to inhibit apoptosis [17,19,20]. This led to the designation of DCC as a dependence receptor.

In addition to DCC, netrin-1 also binds another family of receptors, the UNC5/UNC5H family [21]. Although DCC is proposed to mediate the axonal guidance-related chemoattractive effect of netrin-1, it is believed that UNC5H/UNC5 is more related to the chemorepulsive effect of netrin-1 [22]. However, the predominant work describing the role of UNC5H in axon repulsion was performed in a system in which UNC5H2 was truncated of its C-terminal domain, which contains a death domain, usually found in proteins implicated in cell death regulation. The presence of this death domain and the fact that UNC5H were described as netrin-1 receptors led us and others to assess whether UNC5H are also netrin-1 dependence receptors. Similarly to DCC, the expression of the different UNC5H receptors induces apoptosis in various cell lines, and the presence of netrin-1 inhibits this effect [23,24]. The proapoptotic activity of unbound DCC or UNC5H was not only demonstrated *in vitro* in immortalized cell lines but was also more recently shown *ex vivo* using primary neurons [25,26•] or *in vivo* using animal models such as mice, chicken, or zebrafish upon inactivation of netrin-1, its receptors, or both [23,25,27••].

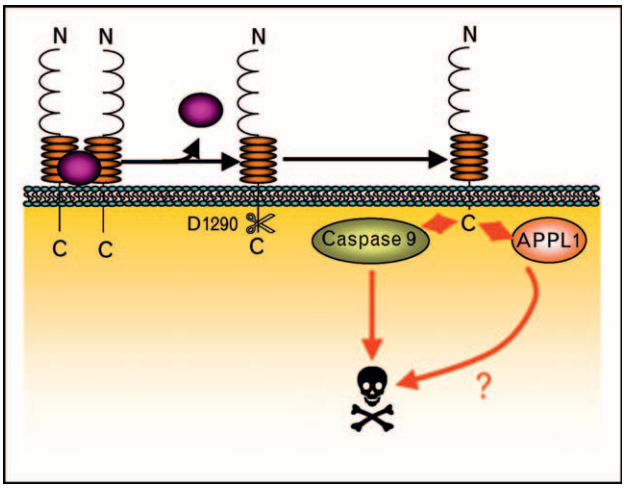
Death and antideath signaling of netrin-1 receptors

The duality of functions of these receptors is associated with a duality in signaling. In presence of netrin-1, DCC and UNC5H transduce classic signals and, in most cases, the activation of these pathways, which we are not going to describe in detail, have been shown to be important for the guidance activity of these receptors. The current view is that in the presence of netrin-1, DCC and UNC5H oligomerize and are then able to recruit different adapter proteins, different kinases such as focal adhesion kinase or extracellular signal-regulated kinases 1 and 2, and, in some case, are phosphorylated [28–30]. These signaling pathways initiated upon ligand binding not only affect migratory and differentiation properties of the cell but also actively inhibit the negative/proapoptotic signaling. Tang *et al.* [26•] and Franke [31] have recently shown that in response to netrin-1, Fyn is activated and phosphorylates phosphatidylinositol 3(P 13)-kinase enhancer, a small GTPase, that in turn is able to interact with UNC5H2 and to inhibit UNC5H2-induced apoptosis.

Although the positive signaling has been studied in depth, how unbound DCC or UNC5H trigger apoptosis is not fully understood. As a common feature of dependence receptors, both DCC and UNC5H receptors are cleaved by caspase in their intracellular domain, and this cleavage is a prerequisite for apoptosis induction by the receptors. The current view is that this cleavage allows the exposure or the release of a proapoptotic domain called addiction/dependence domain (ADD) [23,32,33]. In the case of DCC, the caspase cleavage allows the exposure of a domain located upstream to the caspase site [17]. It has then been described that the DCC–ADD recruits a caspase-activating complex that differs from those implicated in the death receptors and intrinsic-mitochondrial classical apoptotic pathways. In absence of netrin-1, DCC recruits and activates caspase 9, thus allowing caspase 3 activation, but this process does not require cytochrome *c* release and subsequent formation of an apoptosome (cytochrome *c*–apaf-1–caspase 9) complex as is the case in the classical mitochondrial pathway [19]. DCC does not interact directly with caspase 9, so it might recruit one or more adaptor proteins (Fig. 3). One of them may be DCC interacting protein 13 alpha (DIP13α), a protein identified as an interactor of the DCC–ADD and shown to be important for DCC-induced cell death [20] (Fig. 3). However, the precise role of DIP13α in DCC-triggered apoptosis remains quite obscure, as it does not seem to mediate interaction of DCC with caspase 9 and further studies performed on DIP13α, also known as adaptor protein containing PH domain, PTB domain, and leucine zipper motif 1, has not provided clear evidence for a role of this protein in apoptosis induction.

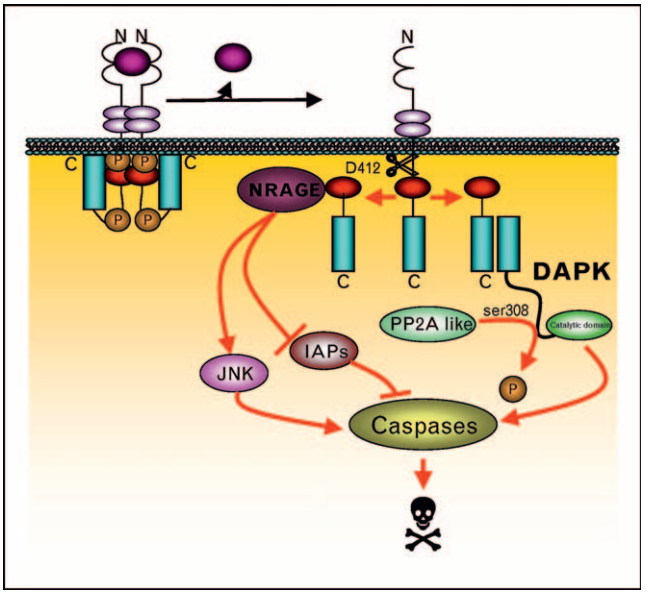
In the case of UNC5H receptors, the caspase cleavage that occurs in the absence of ligand releases a proapoptotic fragment that basically encompasses the whole intracellular domain, which contains the ZU-5 and death domains. Indeed, it was shown that this fragment was sufficient to induce apoptosis when it is myristoylated and overexpressed in immortalized cells [23]. This suggests that a submembrane complex including

Figure 3 Cell death signal through unbound Deleted in Colorectal Cancer



In the absence of netrin-1, DCC monomerizes and reveals a caspase cleavage site at D1290. This cleavage allows the exposure of the DCC–ADD that is responsible for caspase 9 and APPL1 recruitment and induction of apoptosis. ADD, addiction/dependence domain; APPL, adaptor protein containing PH domain, PTB domain, and leucine zipper motif 1; DCC, Deleted in Colorectal Cancer.

Figure 4 Cell death signal through unbound Unc-5 homolog



In the absence of netrin-1, UNC5H receptors adopt an opened conformation, which allow their cleavage at D412 by protease. The cleavage fragment recruits DAPK, which is activated by a PP2A-like phosphatase. An alternative pathway for cell death includes NRAGE interaction. NRAGE may activate the JNK pathway and inhibits IAP to induce apoptosis. DAPK, death-associated protein kinase; IAPs, inhibitor of apoptosis proteins; JNK, c-Jun N-terminal kinase; NRAGE, neurotrophin receptor p75 interaction MAGE homolog; PP2A, protein phosphatase 2A.

UNC5H–ADD could be responsible for apoptosis induction. The ZU-5 domain and the death domain were shown to interact with proapoptotic proteins such as neurotrophin receptor p75 interaction MAGE homolog (NRAGE) and the serine–threonine death-associated protein kinase (DAPK), respectively (Fig. 4). The initial view of NRAGE implication in UNC5H1-induced cell death was that, in the absence of netrin-1, NRAGE is recruited by UNC5H1 through its ZU-5 domain. This interaction would block the inhibitor of apoptosis protein and, as a consequence, would activate caspases. Another possible role of NRAGE could be the activation of the c-Jun N-terminal kinase pathway, which also participates in apoptosis induction [34,35]. However, the implication of the ZU-5 domain in cell death was recently challenged with the determination of the three-dimensional structure of the intracellular domain of UNC5H2 [36••]. Indeed, Wang *et al.* [36••] elegantly demonstrated that UNC5H intracellular domain displays two conformations: a closed conformation in which ZU-5 and death domain interact together, the ZU-5 serving as zip preventing the exposure of the proapoptotic death domain and an opened conformation in which the ZU-5 is not interacting with the death domain, allowing induction of apoptosis through this domain. The working hypothesis is then that upon netrin-1 absence, the death domain of UNC5H is released, interacts with DAPK, and allows its activation with DAPK, which occurs via a loss of its autophosphorylation [37]. One possible explanation for this loss of DAPK autophosphorylation could be the activation of a protein phosphatase and, along this line, it has recently been shown that DAPK is dephosphorylated by a protein phosphatase 2A (PP2A)-like phosphatase [38]. Future work will show whether UNC5H interacts with PP2A and triggers PP2A activation upon netrin-1 withdrawal.

Netrin-1 dependence receptors as homeostasis regulators

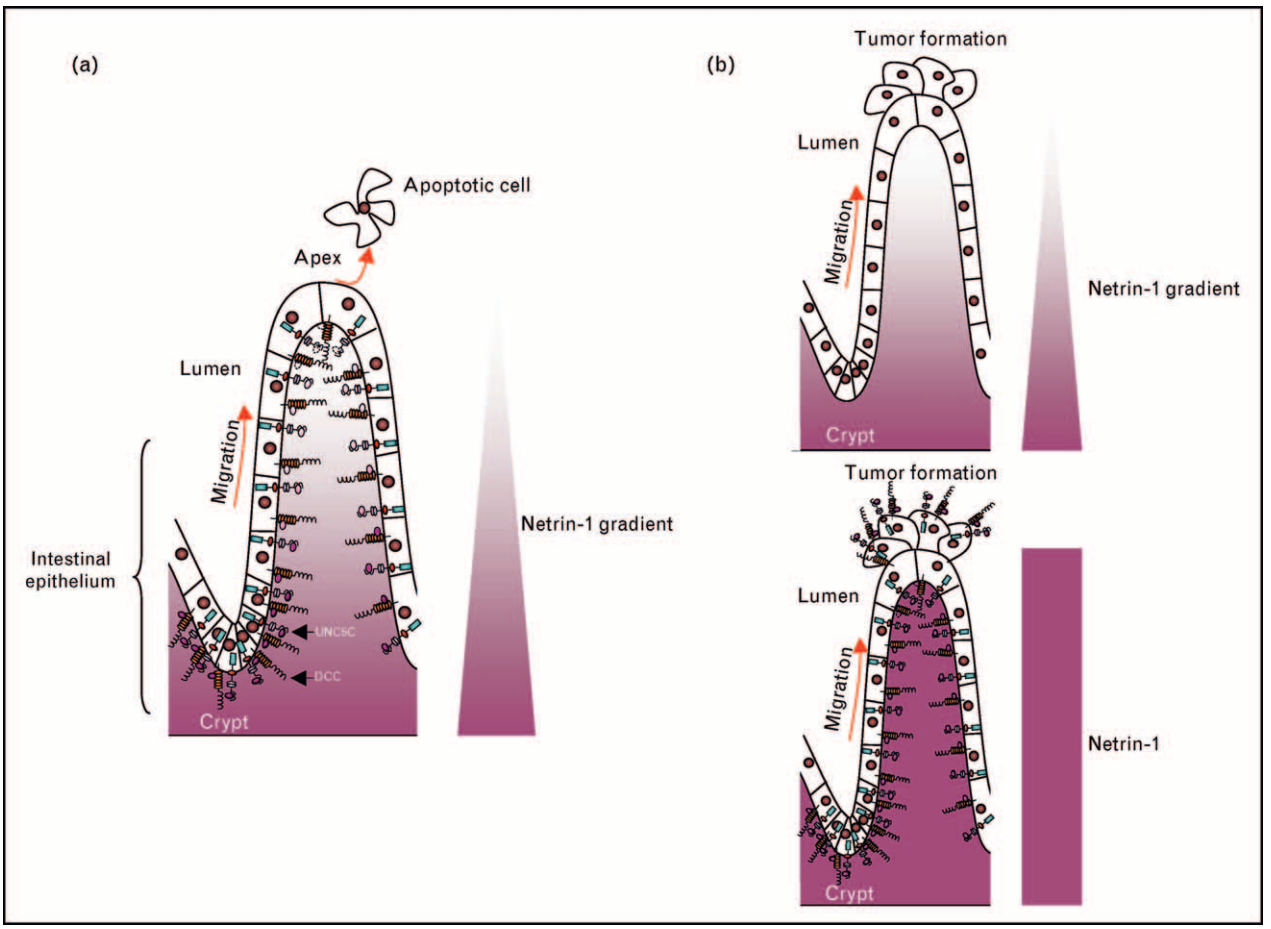
The duality inherent to the dependence receptor function is speculated to play an important role during development by allowing both the migration/differentiation through the positive signal triggered by these receptors in the presence of netrin-1 and the regulation of cell positioning through elimination of cells that would differentiate/migrate in tissues/regions devoid of netrin-1. Along this latter line, the role of netrin-1 as a survival cue during development has been described both during nervous system development [25,26•] and, more recently, during developmental angiogenesis [27••]. Yet the role of the proapoptotic activity of these netrin-1 receptors in adults also appears to be important as a regulator of cell fate and, more generally, homeostasis. In adults, the expression profile of netrin-1 and its receptors suggests that such a mechanism of 'dual control' may exist in other cell types, particularly in tissues with intense cell renewal such as the

intestine and colon. It was indeed shown that netrin-1 is produced at the bottom of crypts formed by the intestinal villi, whereas DCC is detected throughout the villi [39], with the view being that there is a gradient of netrin-1 concentration along the intestinal villus. The working model is then that, at the bottom of the crypts, the proliferating cells expressing DCC are subject to a high concentration of netrin-1 and are thus protected from death by apoptosis. In contrast, cells that stop proliferating and instead differentiate and migrate towards the apical part of the intestinal villus and are subjected to a decreasing concentration of ligand, which gradually leads to cell death by apoptosis (Fig. 5). This model is supported by the fact that, in mice, forced expression of netrin-1 throughout the intestinal epithelium causes a reduction of half the rate of intestinal apoptosis [39]. As such, the gradient of netrin-1 would represent a safeguard mechanism regulating the 'time of life' of the intestinal cells by eliminating cells that have undergone many cycles of proliferation in the crypts or that have been submitted to mechanical and chemical-associated injuries. As a consequence, cells that could escape apoptosis through this mechanism are potentially dangerous cells. Along this same line, mice that are forced to express netrin-1 or that are inactivated by one of its dependence receptors show increased intestinal tumor progression [39–41], thus supporting the view that netrin-1 and its receptors DCC or UNC5H are key regulators of tumor development.

Dependence receptors as tumor suppressors

The ability of DCC and UNC5H to trigger apoptosis in settings of netrin-1 limitations is thus speculated to be a safeguard mechanism preventing primary tumor proliferation within a tissue with limited expression of netrin-1 or tumor metastasis in niches devoid of netrin-1. As such, it would be expected that aggressive tumor cells should

Figure 5 Regulation of colon homeostasis by the pairs Unc-5 homolog/netrin-1 and/or Deleted in Colorectal Cancer/netrin-1



(a) In normal condition, a netrin-1 gradient is formed from the bottom of the crypt to the apex, whereas DCC and UNC5H receptors are expressed all over the epithelium. In this setting, epithelial cells that are highly proliferative and located at the bottom of the crypt avoid apoptosis, whereas cells that are migrating toward the apex find less and less netrin-1 available and die. (b) When UNC5C/DCC are mutated and inactivated (upper panel) or if netrin-1 is abnormally expressed (below panel), the normal homeostasis of the intestine is modulated, cells are not eliminated through apoptosis and this provides a selective advantage for tumor development. DCC, Deleted in Colorectal Cancer; UNC5H, Unc-5 homolog.

block this dependence receptor pathway to survive. The primary way to do so is to inactivate the dependence receptor by itself. Along this line, the receptor DCC was described in 1990 as a potential tumor suppressor gene involved in the advanced stages of colorectal carcinogenesis because its expression is strongly reduced in this disorder. Indeed, the *DCC* gene is located at chromosome 18q, a chromosome region not only deleted in 70% of colorectal cancers but also in many other tumor types [16,42]. Several studies have linked loss of heterozygosity of chromosome 18q and a reduced expression of DCC at the RNA [43] or protein [44] level. Furthermore, deletion of the chromosomal region 18q or loss of DCC expression was associated with bad prognosis in colorectal tumors. The presence of the tumor suppressor gene *SMAD4* locus at 18q close to DCC [45] and the low number of mutations found within the *DCC* gene are data that have raised doubt on the tumor suppressor role of DCC. However, a whole series of studies show that the reintroduction of *DCC* gene suppresses the tumorigenic properties of cells, which have lost the expression of DCC [46,47]. Recent data obtained through the use of more restrictive markers also confirm the loss of DCC in 70% of colorectal cancers [48]. Furthermore, it was observed that not only in over 90% of colorectal tumors but also in many other tumors [49], UNC5H expression is significantly reduced, particularly, through epigenetic processes such as promoter methylation [15,40].

To demonstrate that netrin-1 receptors loss of expression observed in the human disorder is a causal event for cancer progression, animal models have been used. Although initial data on DCC inactivation in mouse fails to demonstrate any link between DCC loss and tumor predisposition [50], a more recent study [51] strengthens the view that netrin-1 dependence receptors are key negative regulators of cancer progression. First, forced expression of netrin-1 throughout the intestinal epithelium in transgenic mice, which is supposed to inhibit both DCC and UNC5H-induced apoptosis in these tissues, was associated with the development of focal hyperplasia and adenoma in the intestine [39]. Moreover, in the mouse model for intestinal adenoma predisposition (carrying a mutation in the adenomatosis polyposis coli or *APC* gene), netrin-1 overexpression favored adenocarcinoma formation [39]. Thus, netrin-1 overexpression is associated not only with the initiation of tumorigenesis but also with tumor progression. To more specifically mimic the human colorectal cancer disorder in which there is generally not a gain of netrin-1 but rather a loss of netrin-1 receptors, intestinal tumor progression was analyzed in UNC5H3 mutant mice [40]. Mutation of *UNC5H3* gene in mice is also associated with intestinal tumor progression [40], thus demonstrating that, *per se*, UNC5H3 (and therefore by analogy probably DCC and other UNC5H receptors) is a tumor suppressor.

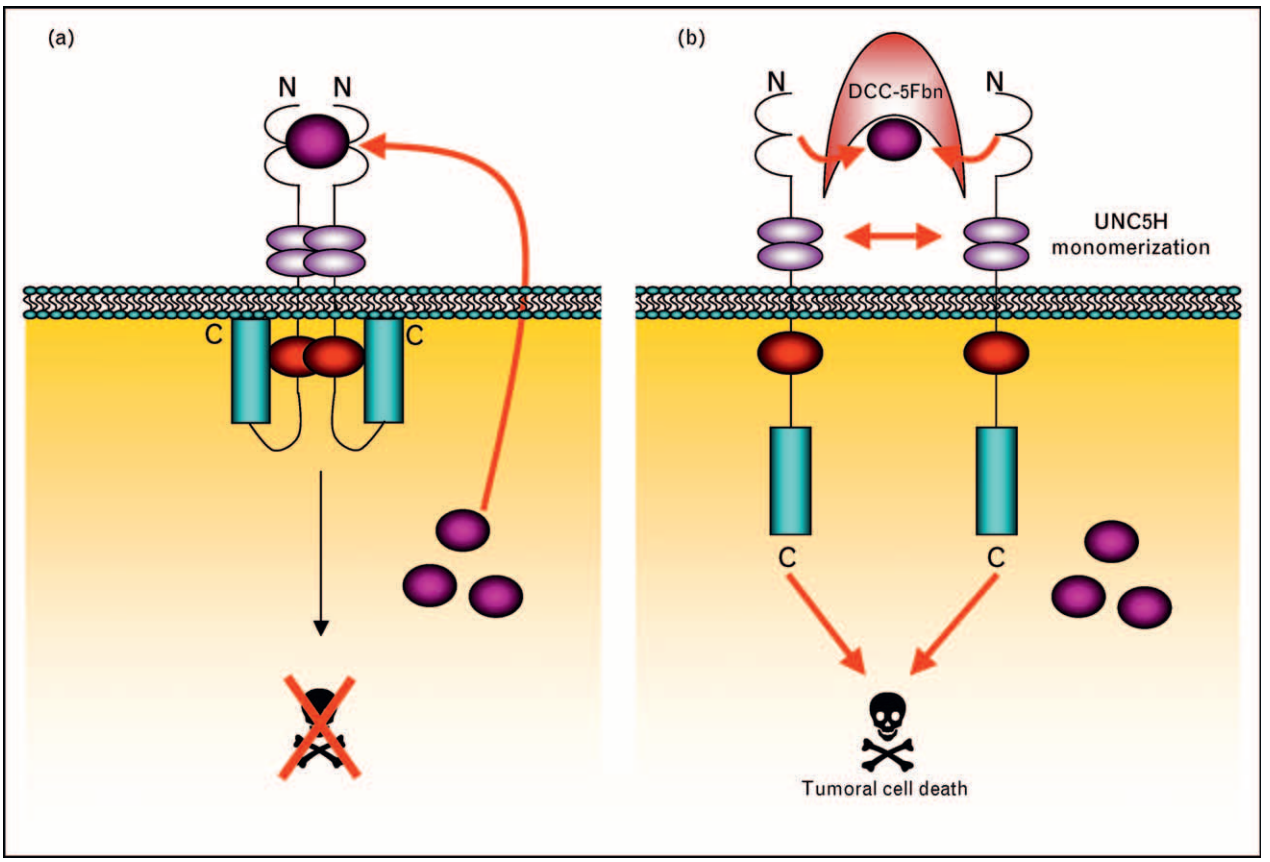
Dependence receptors as original targets for cancer therapy

If the demonstration that netrin-1 dependence receptors are tumor suppressors is interesting in terms of academic research, the loss of expression of these receptors observed in many cancers such as colorectal cancer fails, at a first glance, to make them appealing for therapy. However, the model of dependence receptors predicted that instead of losing netrin-1 receptors, a second potential selective advantage for tumor cell survival could be an autocrine expression of the ligand. This should, theoretically, lead to constitutive blocking of apoptosis induced by these netrin-1 dependence receptors.

In this sense, it was recently shown that netrin-1 is upregulated and autocrinally produced in more than 60% of metastatic breast cancer [52••], in 47% of lung cancer [53••], in 38% of neuroblastoma [54••], and in a large fraction of pancreatic cancer [55]. The mechanism associated with this gain of netrin-1 is, at this stage, unclear. It does not appear to be due to gene amplification but rather to a change in promoter activity [54••]. Along this line, it was recently demonstrated that netrin-1 is a direct transcriptional target of the nuclear factor kappa B (NFκB) transcription factor, and that NFκB activation in tumor cell is associated with netrin-1 upregulation [56]. As a direct consequence in sporadic colorectal cancer, netrin-1 receptors expression is decreased, whereas netrin-1 is rarely upregulated; in colorectal cancers associated with chronic inflammatory diseases such as ulcerative colitis and Crohn's disease, netrin-1 is massively upregulated [57•]. This suggests that such a gain of netrin-1 expression allows tumor cells to survive independently of the limited presence of netrin-1 in the extracellular environment (Fig. 6). This can confer to the tumor cell both a selective advantage to survive while growing in the primary site but also to migrate freely away from the 'physiological' accessibility of the ligand netrin-1, and thus to colonize other tissues and metastasize. Along this line, a cohort's study [55] shows that a high-rate netrin-1 expression significantly influences the time of relapse of patients with pancreatic adenocarcinoma and is associated with a poor prognosis. Similarly, a recent study [54••] demonstrated a high expression of netrin-1 in metastatic neuroblastoma with poor prognosis.

This gain of netrin-1 has been demonstrated to be a selective advantage for tumor cells to survive. Indeed, in tumor cells with autocrine expression of netrin-1, downregulation of this ligand by small interfering RNA strategies or interference with netrin-1/receptors interaction by a decoy recombinant protein have been shown to be associated with tumor cell death, both *in vitro* and in different animal models related to metastatic breast cancer, lung cancer, neuroblastoma, or inflammatory

Figure 6 Netrin-1/receptors interference as a promising therapeutic strategy



(a) In a large fraction of breast, lung, and pancreas cancers, and in neuroblastomas, a specific growth selective advantage is occurring, that is, netrin-1 is autocrinally produced. This mechanism triggers inhibition of DCC/UNC5H-induced apoptosis and is associated with tumor growth and dissemination. (b) Netrin-1 titrating compounds have been developed and restore cell death in these specific netrin-1 high tumors. DCC, Deleted in Colorectal Cancer; UNC5H, Unc-5 homolog.

bowel diseases-associated colorectal cancer (Fig. 6). Thus, a tempting alternative therapeutic approach could be to develop compounds that either sequester netrin-1, netrin-1 receptors, or that inhibit/interfere with netrin-1/receptors interaction. Some biologics, which target netrin-1/receptors interaction, are currently under preclinical evaluation. Such compounds are potentially of great interest because in the first case, it would concern a wide fraction of patients with different types of cancers (lung, breast, etc.). Second, as the target is outside the cell, this leads to the possible development of biologics and to a possible reduced high-dose-associated toxicity. Third, such dependence receptors-targeted-based therapy could be associated with other conventional anticancer treatments such as chemotherapy. Indeed, the deregulation of classical apoptotic pathways is frequently associated with resistance of tumor cells to conventional anticancer treatment, whereas targeting dependence receptors should trigger apoptosis independently of the classic intrinsic and extrinsic pathways of cell death [19,58]. Fourth, a recent report suggests that netrin-1 upregulation promotes not only the survival of epithelial cells but also that of endothelial cells. Along this line, it was shown during zebrafish development that netrin-1 promotes angiogenesis by allowing the survival of endothelial cells via inhibition of UNC5H2-induced apoptosis [27••]. Thus, even though it has to be shown that this prosurvival effect of netrin-1 on endothelial cells also occurs in adult and in higher organisms, it could be tempting to speculate that titrating netrin-1 in tumors with high netrin-1 level could not only be associated with the death of tumor epithelial cells but also of endothelial cells, and consequently of vessels breeding the tumor.

Conclusion

Altogether the in-vivo assays with such interfering drugs are really promising so far [52••–54••] and this suggests that a large effort has to be made to develop drugs targeting netrin-1. However, a major uncertainty is related to the effect of these compounds in normal cells and, as a consequence, to the side effects of such treatment. Although

netrin-1 and its receptors are known to play an important role during the development, very little is known about the effect in adult organisms. What effect will netrin-1 perturbation have in gut homeostasis or in branching organs? Toxicology studies should soon tell whether these drugs represent a definitive hope for cancer treatment. One should also keep in mind that, to date, more than 15 dependence receptors have been identified, and the list is probably far from being completed. If it is assumed that each of these receptors is a tumor suppressor and that, consequently, a loop of autocrine production of ligands for these receptors should have been selected in a fraction of cancer, it could be tempting to speculate that this paradox of dependence receptors opens a large field of original targets in cancer therapy.

References and recommended reading

Papers of particular interest, published within the annual period of review, have been highlighted as:
• of special interest
•• of outstanding interest

Additional references related to this topic can also be found in the Current World Literature section in this issue (p. 75).

1 Mehlen P, Thibert C. Dependence receptors: between life and death. Cell Mol Life Sci 2004; 61:1854–1866.

2 Bredesen DE, Mehlen P, Rabizadeh S. Apoptosis and dependence receptors: a molecular basis for cellular addiction. Physiol Rev 2004; 84:411–430.

3 Bredesen DE, Mehlen P, Rabizadeh S. Receptors that mediate cellular dependence. Cell Death Differ 2005; 12:1031–1043.

4 Serafini T, Kennedy TE, Galko MJ, *et al.* The netrins define a family of axon outgrowth-promoting proteins homologous to *C. elegans* UNC-6. Cell 1994; 78:409–424.

5 Serafini T, Colamarino SA, Leonardo ED, *et al.* Netrin-1 is required for commissural axon guidance in the developing vertebrate nervous system. Cell 1996; 87:1001–1014.

6 Bloch-Gallego E, Ezan F, Tessier-Lavigne M, Sotelo C. Floor plate and netrin-1 are involved in the migration and survival of inferior olivary neurons. J Neurosci 1999; 19:4407–4420.

7 Yebra M, Montgomery AM, Diaferia GR, *et al.* Recognition of the neural chemoattractant netrin-1 by integrins alpha6beta4 and alpha3beta1 regulates epithelial cell adhesion and migration. Dev Cell 2003; 5:695–707.

8 Jiang Y, Min-tsai L, Gershon MD. Netrins and DCC in the guidance of migrating neural crest-derived cells in the developing bowel and pancreas. Development 2003; 258:364–384.

9 Srinivasan K, Strickland P, Valdes A, *et al.* Netrin-1/neogenin interaction stabilizes multipotent progenitor cap cells during mammary gland morphogenesis. Dev Cell 2003; 4:371–382.

10 Liu Y, Stein E, Oliver T, *et al.* Novel role for netrins in regulating epithelial behavior during lung branching morphogenesis. Curr Biol 2004; 14:897–905.

11 Lu X, Le Noble F, Yuan L, *et al.* The netrin receptor UNC5B mediates guidance events controlling morphogenesis of the vascular system. Nature 2004; 432:179–186.

12 Park KW, Crouse D, Lee M, *et al.* The axonal attractant Netrin-1 is an angiogenic factor. Proc Natl Acad Sci U S A 2004; 101:16210–16215.

13 Larrivee B, Freitas C, Trombe M, *et al.* Activation of the UNC5B receptor by Netrin-1 inhibits sprouting angiogenesis. Genes Dev 2007; 21:2433–2447.

14 Manitt C, Kennedy TE. Where the rubber meets the road: netrin expression and function in developing and adult nervous systems. Prog Brain Res 2002; 137:425–442.

15 Carvalho AL, Chuang A, Jiang WW, *et al.* Deleted in colorectal cancer is a putative conditional tumor-suppressor gene inactivated by promoter hypermethylation in head and neck squamous cell carcinoma. Cancer Res 2006; 66:9401–9407.

16 Fearon ER, Cho KR, Nigro JM, *et al.* Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers. Science 1990; 247:49–56.

17 Mehlen P, Rabizadeh S, Snipas SJ, *et al.* The DCC gene product induces apoptosis by a mechanism requiring receptor proteolysis. Nature 1998; 395:801–804.

18 Chen YQ, Hsieh JT, Yao F, *et al.* Induction of apoptosis and G2/M cell cycle arrest by DCC. Oncogene 1999; 18:2747–2754.

19 Forcet C, Ye X, Granger L, *et al.* The dependence receptor DCC (Deleted in Colorectal Cancer) defines an alternative mechanism for caspase activation. Proc Natl Acad Sci U S A 2001; 98:3416–3421.

20 Liu J, Yao F, Wu R, *et al.* Mediation of the DCC apoptotic signal by DIP13 alpha. J Biol Chem 2002; 277:26281–26285.

21 Chan SS, Zheng H, Su MW, *et al.* UNC-40, a *C. elegans* homolog of DCC (Deleted in Colorectal Cancer), is required in motile cells responding to UNC-6 netrin cues. Cell 1996; 87:187–195.

22 Hong K, Hinck L, Nishiyama M, *et al.* A ligand-gated association between cytoplasmic domains of UNC5 and DCC family receptors converts netrin-induced growth cone attraction to repulsion. Cell 1999; 97:927–941.

23 Llambi F, Causeret F, Bloch-Gallego E, Mehlen P. Netrin-1 acts as a survival factor via its receptors UNC5H and DCC. EMBO J 2001; 20:2715–2722.

24 Tanikawa C, Matsuda K, Fukuda S, *et al.* p53RDL1 regulates p53-dependent apoptosis. Nat Cell Biol 2003; 5:216–223.

25 Furne C, Rama N, Corset V, *et al.* Netrin-1 is a survival factor during commissural neuron navigation. Proc Natl Acad Sci U S A 2008; 105: 14465–14470.

26 • Tang X, Jang SW, Okada M, *et al.* Netrin-1 mediates neuronal survival through PIKE-L interaction with the dependence receptor UNC5B. Nat Cell Biol 2008; 10:698–706.
This study shows the role of netrin-1 as a survival factor during nervous system development.

27 •• Castets M, Coissieux MM, Delloye-Bourgeois C, *et al.* Inhibition of endothelial cell apoptosis by netrin-1 during angiogenesis. Dev Cell 2009; 16:614–620.
This study shows the role of netrin-1 as a survival factor during angiogenesis.

28 Mille F, Llambi F, Guix C, *et al.* Interfering with netrin-1 receptors multimerization triggers apoptosis. Cell Death Differ 2009; 16:1344–1351.

29 Li W, Aurandt J, Jurgensen C, *et al.* FAK and Src kinases are required for netrin-induced tyrosine phosphorylation of UNC5. J Cell Sci 2006; 119:47–55.

30 Killeen M, Tong J, Krizus A, *et al.* UNC-5 function requires phosphorylation of cytoplasmic tyrosine 482, but its UNC-40-independent functions also require a region between the ZU-5 and death domains. Dev Biol 2002; 251:348–366.

31 Franke TF. PI3K/Akt: getting it right matters. Oncogene 2008; 27:6473–6488.

32 Bordeaux MC, Forcet C, Granger L, *et al.* The RET proto-oncogene induces apoptosis: a novel mechanism for Hirschsprung disease. EMBO J 2000; 19:4056–4063.

33 Thibert C, Teillet MA, Lapointe F, *et al.* Inhibition of neuroepithelial patched-induced apoptosis by sonic hedgehog. Science 2003; 301:843–846.

34 Williams ME, Strickland P, Watanabe K, Hinck L. UNC5H1 induces apoptosis via its juxtamembrane domain through an interaction with NRAGE. J Biol Chem 2003; 278:17483–17490.

35 Dhanasekaran DN, Reddy EP. JNK signaling in apoptosis. Oncogene 2008; 27:6245–6251.

36 •• Wang R, Wei Z, Jin H, *et al.* Autoinhibition of UNC5b revealed by the cytoplasmic domain structure of the receptor. Mol Cell 2009; 33:692–703.
Really interesting paper adding clues on the mechanistic proapoptotic activity of UNC5H2.

37 Llambi F, Lourenco FC, Gozuacik D, *et al.* The dependence receptor UNC5H2 mediates apoptosis through DAP-kinase. EMBO J 2005; 24:1192–1201.

38 Gozuacik D, Bialik S, Raveh T, *et al.* DAP-kinase is a mediator of endoplasmic reticulum stress-induced caspase activation and autophagic cell death. Cell Death Differ 2008; 15:1875–1886.

39 Mazelin L, Bernet A, Bonod-Bidaud C, *et al.* Netrin-1 controls colorectal tumorigenesis by regulating apoptosis. Nature 2004; 431:80–84.

40 Bernet A, Mazelin L, Coissieux MM, *et al.* Inactivation of the UNC5C Netrin-1 receptor is associated with tumor progression in colorectal malignancies. Gastroenterology 2007; 133:1840–1848.

41 Grady WM. Making the case for DCC and UNC5C as tumor-suppressor genes in the colon. Gastroenterology 2007; 133:2045–2049.

42 Cho KR, Oliner JD, Simons JW, *et al.* The DCC gene: structural analysis and mutations in colorectal carcinomas. Genomics 1994; 19:525–531.

43 Thiagalingam S, Lengauer C, Leach FS, *et al.* Evaluation of candidate tumour suppressor genes on chromosome 18 in colorectal cancers. Nat Genet 1996; 13:343–346.

44 Goi T, Yamaguchi A, Nakagawara G, *et al.* Reduced expression of Deleted Colorectal Carcinoma (DCC) protein in established colon cancers. Br J Cancer 1998; 77:466–471.

45 Carethers JM, Hawn MT, Greenson JK, *et al.* Prognostic significance of allelic lost at chromosome 18q21 for stage II colorectal cancer. Gastroenterology 1998; 114:1188–1195.

46 Velcich A, Corner G, Palumbo L, Augenlicht L. Altered phenotype of HT29 colonic adenocarcinoma cells following expression of the DCC gene. Oncogene 1999; 18:2599–2606.

47 Kato H, Zhou Y, Asanoma K, *et al.* Suppressed tumorigenicity of human endometrial cancer cells by the restored expression of the DCC gene. Br J Cancer 2000; 82:459–466.

48 Shin SK, Nagasaka T, Jung BH, *et al.* Epigenetic and genetic alterations in Netrin-1 receptors UNC5C and DCC in human colon cancer. Gastroenterology 2007; 133:1849–1857.

49 Thiebault K, Mazelin L, Pays L, *et al.* The netrin-1 receptors UNC5H are putative tumor suppressors controlling cell death commitment. Proc Natl Acad Sci U S A 2003; 100:4173–4178.

50 Fazeli A, Dickinson SL, Hermiston ML, *et al.* Phenotype of mice lacking functional Deleted in colorectal cancer (Dcc) gene. Nature 1997; 386: 796–804.

51 Mehlen P, Puisieux A. Metastasis: a question of life or death. Nat Rev Cancer 2006; 6:449–458.

52 •• Fitamant J, Guenebeaud C, Coissieux MM, *et al.* Netrin-1 expression confers a selective advantage for tumor cell survival in metastatic breast cancer. Proc Natl Acad Sci U S A 2008; 105:4850–4855.
The first study showing upregulation of netrin-1 in cancer.

53 •• Delloye-Bourgeois C, Brambilla E, Coissieux MM, *et al.* Interference with netrin-1 and tumor cell death in nonsmall cell lung cancer. J Natl Cancer Inst 2009; 101:237–247.
An important study showing that targeting netrin-1 in lung cancer could be a promising therapy.

54 •• Delloye-Bourgeois C, Fitamant J, Paradisi A, *et al.* Netrin-1 acts as a survival factor for aggressive neuroblastoma. J Exp Med 2009; 206:833–847.
An important study showing that targeting netrin-1 in neuroblastoma could be a promising therapy.

55 Link BC, Reichelt U, Schreiber M, *et al.* Prognostic implications of netrin-1 expression and its receptors in patients with adenocarcinoma of the pancreas. Ann Surg Oncol 2007; 14:2591–2599.

56 Paradisi A, Maisse C, Bernet A, *et al.* NF-kappaB regulates netrin-1 expression and affects the conditional tumor suppressive activity of the netrin-1 receptors. Gastroenterology 2008; 135:1248–1257.

57 • Paradisi A, Maisse C, Coissieux MM, *et al.* Netrin-1 up-regulation in inflammatory bowel diseases is required for colorectal cancer progression. Proc Natl Acad Sci U S A 2009; 106:17146–17151.
An interesting study linking netrin-1 upregulation and IBD-associated colorectal cancer.

58 Mille F, Thibert C, Fombonne J, *et al.* The Patched dependence receptor triggers apoptosis through a DRAL–caspase-9 complex. Nat Cell Biol 2009; 11:739–746.

Annexe II : Tableau récapitulatif des partenaires potentiels de la signalisation pro-apoptotique induite par les récepteurs UNC5H en absence de Nétrine-1.

Ces partenaires peuvent être regroupés par leur fonction. On retrouve des effecteurs de l'apoptose (en gris), des protéines kinases et phosphatase (en rose), des récepteurs transmembranaires (en jaune), des protéines de transport et de structure (en vert), des régulateurs transcriptionnels et traductionnels (en bleu) et d'autres protéines avec des fonctions isolées (en blanc)

	gènes ciblés par le siRNA (résultats issus d'un BLAST des séquences)	autre gène potentiel-lement ciblé	type de protéine et fonction	lien connu avec l'apoptose ?	ref
Effecteurs de l'apoptose	Cathepsin Z (CTSZ)	-	Protéase à cystéine dont les subtrats n'ont pas encore été identifiés	?	Santamaria J Biol Chem 1998
	poly ADP ribode glycohydrolase (PARG)	-	Glycohydrolase qui participerait à l'activation de PARP au cours de l'apoptose	plutôt pro-apoptotique	Faseb J. 2009 Erdélyi et al ;
Protéines kinases et phosphatase	protein tyrosine phosphatase, receptor type, S (PTPRS)	-	récepteur transmembranaire à activité tyrosine Kinase, inhibiteur de la régénation neuronale et de l'inflammation du colon	plutôt pro-apoptotique	Shen, Science 2009 ; Muise Curr Biol 2007
	protein phosphatase 1A (formerly 2C) magnesium dependent alpha isoform (PPM1A)	-	sérine/thréonine protéine phosphatase impliqué dans la régulation du stress, de l'apoptose, de la survie et de la différenciation mais subtrats peu connus	plutôt pro-apoptotique	shi, cell 2009
	Protein phosphatase 2 (formerly 2A) subunit A (PR65), βisoform (PPP2RB1)	-			
	A kinase (PRKA) anchor protein 11 (AKAP11)	-	Protéine kinase régulatrice de l'activité de la PKA	?	Michel et al Annu Rev Pharmacol toxicol 2002
	Pyrophosphatase (inorganic) 1 (PPA1)	-	Protéine phosphatase impliquée dans la production collagène I	?	Polewski, 2009, Bone
	serine/threonine kinase 24 (STE20 homolog)	-	sérine/thréonine protéine phosphatase activée suite à un stimulus pro-apoptotique par déphosphorylation impliquant PP2A ; contribuant à l'apoptose en phosphorylant certains facteurs de transcription (FOXO) et d'autres subtrats cytoplasmiques	plutôt pro-apoptotique	Radu Chernoff curr biol, 2009
	CHK1 checkpoint homolog (CHEK1)	-	protéine kinase impliquée dans l'arrêt du cycle cellulaire et associée à la progression tumorale	plutôt anti-apoptotique	Gali-Muhtasib, Cancer Res 2008
	mitogen activated protein kinase 6 (MAPK6)	-	Sérine/Thréonine kinase de type MAPK mais dont les cibles de sont pas connues	?	
	STE-20 like protein kinase 3 (STK3)	-	homologue de STE-20	plutôt pro-apoptotique	

Protéines de transport et de structure	Lithostathine (REG1A)	-	protéine matricielle impliquée dans la régénération pancréatique	(protéine pro et anti-apoptotique)	Sekikawa, Carcinogenesis 2008 Yamakoa et al, 2000
	sciellin (SCEL)	-	protéine de structure	?	Kvedar et al, Differenciation 1992
	Kinesine Family member 15 (KIF15)	-	protéine de transport cytosquelettique impliquée dans la mitose et dans la migration et de développement neuronal	?	Buster et al, 2003 J Neurocytol
	MTRF1 (Mitochondrial translational release factor 1)	Pyruvate Deshydrogenase catalytic subunit (match : 15/27nt)	Protéine d'origine mitochondriale capable de lier l'ADN. Fonction inconnue	?	Hansen et al, 2000, Cytogenet cell genet
	Voltage gated channel shaker-related B member 3 (KCNAB3)	F-Box protein 48 (match : 18/27nt)	Transporteur du potassium intracellulaire	?	Leicher et al, J Biol Chem 1998
	Microfibrillar associated protein 5 (MPAP5)	-	?	?	
	Blocked early in transport 1 homolog (BET1)	-	Facteur impliqué dans le transport de l'appareil du réticulum vers l'appareil de golgi	?	Ferro-Novick & Newman, Cell Biophys 1991
	Thymosin beta 15a (TMSB15A)	-	Protéine surexprimée dans les cancers (Neuroblatome et pancréas) et impliquée dans le remodellage cytosquelettique.	?	Choe et al, Biochem Biophys Res commun 2005
	Microtubule-actin crosslinking factor 1 (MACF1)	-	Plakine (élément cytosquelettique) lié à l'appareil de Golgi, protéine structurale	?	Lin et al, J Cell Science 2005
	testraspanin 32 (TSPAN32)	UNC119 (15/26nt)	Protéine membranaire impliquée dans l'adhésion cellule-cellule	?	
	EVH1 domain binding protein	Fyn Binding Protein	Protéine impliquée dans le modelage du cytosquelette	?	
	Translocase of Inner Mitochondrial member 13 homlog	-	Protéine de transport mitochondriale	?	
	Golgi Vesicular membran trafficking protein p18	-	Protéine de transport	?	
	Karyopherin alpha 1 (importin alpha5)	-	Transporteur intracellulaire	?	

Régulateurs transcriptionnels, et post-transcriptionnels	LSM6 homolog (U6 small nuclear RNA associated Homolog)	-	Protéine s'associant aux petits ARN nuclaires	?	
	Tis11d (tristetraproline) / Zinc Finger protein 36 (ZFP36L2)	-	Facteur modulant la traduction, induit au cours de l'apoptose induite par p53	plutôt pro-apoptotique	Jackson et al 2006, Cell Cycle
	Zinc finger protein 117 (KRAB family)	-	Protéine en doigt de zinc à fonction régulant *a priori* la transcription mais dont les cibles de sont pas connues	?	
	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 4 (GalNAc-T4)	-	Transférase capable de réaliser des modifications post-traductionnelles (transfert de groupement : acetylgalactpsaminyltransferase) qui modulerait l'activité de protéines cibles	?	
	KH domain containing RNA binding signal transduction associated 1 (KHDRBS1/Sam68)	-	Régulateur transcriptionnel et post-transcriptionnel impliqué dans l'apoptose, le métabolisme de l'ARN et la régulation du cycle cellulaire	plutôt anti-apoptotique	Rajan Gaughan Biochem soc trans, 2008
autres protéines	mature T cell proliferation 1, nuclear gene encoding mitochondrial protein (MTCP1)	PLAGL2 (match : 15/24 nt)	Protéine activatrice d'Akt, surexprimée dans les leucémies	plutôt anti-apoptotique	Despouy et al, Blood, 2007
	TRK-fused gene	-	Protéine subtrat de c-Src et capable d'activer NFKB	plutôt anti-apoptotique	Miranda et al, 2006 J Cell Physiol, Amanchy et al, J proteome Res 2008
	BCL-6 (B-Cell Lymphoma)	-	Protéine anti-apoptotique impliquée notamment dans les lymphomes et le cancer du sein (mode d'action inconnu)	plutôt anti-apoptotique	Cerchietti et al 2009, Nat Med
	MMP 26	Neogenin Homolog 1 (match 15/20nt)	Métalloprotéase impliquée dans le développement et fréquemment surexprimée dans les cancers	?	Li, Cell Res 2006
	Pleiomorphic adenoma gene like-2 (PLAGL2)	-	Facteur de transcription participant à la dégradation de p53	plutôt anti-apoptotique	Declercq et al, Ann N Y Acad Sci, 2003 ; Zheng et al Biochem Biophys commun 2007
	Sec23 homolog A	-	Fonction inconnue	?	
	Fibrinogen A chaine beta	-	Protéine pro-inflammatoire impliquée dans la coagulation	?	
	Casein Beta	-	Fonction inconnue	?	
	S phase associated protein kinase 2 (SKP2)	-	Protéine kinase régulant le cycle cellulaire		Seki R. et al 2009 Ann Oncol
	complement component 6	Gremlin1 (match :16/27nt)	Facteur de complément participant à l'élimination de pathogènes	?	
	prostagladin-endoperoxide synthase 1 (COX1)	-	Fréquement perdu dans les cancers cox1 aurait un rôle anti-apoptotique via la régulation d'Akt. Cox1 est également capable d'induire FasL (controverse)	pro et anti-apoptotique	O'Callaghan et al, Br J Cancer 2008; Wu et al Cell res 2009
	ELOVL family member 5 (EVOLV5)	-	Protéine impliquée dans la sythèse des sphingolipides	?	Tvrdik J Cell biol 2000
	Cyclin dependent kinase inhibitor 1B (p27, KIP1)	-	Protéine régulatrice du cycle cellulaire	?	
	Pyruvate Deshydrogenase catalytic subunit (match : 15/27nt)	-	Protéine impliquée dans le métabolisme du pyruvate	?	

Annexe III : Tableau récapitulatif des partenaires potentiels de la signalisation pro-apoptotique induite par les récepteurs UNC5H en absence de Nétrine-1 et identifié après nBLAST des séquences siRNA

	Gène potentiel	fonction	rôle apoptotique ?	référence
protéines obtenues après BLAST des séquences siRNA	Pyruvate Deshydrogenase catalytic subunit (match : 15/27nt)	Protéine impliquée dans le métabolisme du pyruvate	?	
	F-Box protein 48 (FBXO48) (match : 18/27nt)	Régulateur de la stabilité protéique. Cibles inconnues	?	
	UNC119	Protéine adaptatrice impliquée dans le développement du système nerveux ; régulatrice de l'endocytos et capable de stimuler Fyn et p38MAPK	plutôt antiapoptotique	Vepachedu, J immuno 2007 ; Karim, cell signal 2010
	Neogenin-1 homolog	Récepteur transmembranaire. Fonction inconnue	?	
	Fyn Binding Protein (FYB 120/130)	Protéine liant et activant la protéine kinase Fyn	plutôt antiapoptotique	
	Gremlin1 cysteine knot superfamily homolog (16/27nt)	Antagoniste des BMP (Bone Morphogenetic Protein) impliquée dans l'inhibition de la différenciation	?	Kosinski PNAS, 2007