



Implication du récepteur à dépendance TRKC et de son ligand NT-3 en cancérogénèse : de la recherche fondamentale à la thérapeutique

Anne-Laure Genevois

► To cite this version:

Anne-Laure Genevois. Implication du récepteur à dépendance TRKC et de son ligand NT-3 en cancérogénèse : de la recherche fondamentale à la thérapeutique. Biologie moléculaire. Université Claude Bernard - Lyon I, 2013. Français. NNT : 2013LYO10112 . tel-01067136

HAL Id: tel-01067136

<https://theses.hal.science/tel-01067136>

Submitted on 23 Sep 2014

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.

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Délivrée par

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

Ecole Doctorale BMIC

Pour l'obtention du

DIPLOME DE DOCTORAT

(Arrêté du 7 août 2006)

Soutenue publiquement le 9 juillet 2013

Par Anne-Laure GENEVOIS

**Implication du récepteur à dépendance TRKC et de son ligand NT-3
en cancérogenèse.
De la recherche fondamentale à la thérapeutique.**

Directrice de thèse : Servane Tauszig-Delamasure

Directeur du laboratoire : Patrick Mehlen

Jury :

Président du jury : Pr SAURIN Jean-Christophe

Rapporteur : Dr LEGEMBRE Patrick

Rapporteur : Dr Le BOURHIS Xuefen

Examineur : Dr BERTOLINO Philippe

Examineur : Dr TAUSZIG-DELAMASURE Servane

REMERCIEMENTS

Une sacrée aventure qui se termine !

Merci à toute la Mehlen Team pour ces trois années, riches en rebondissements et en rencontres, et merci à Servane et Patrick de m'avoir accompagnée jusqu'à la fin.

Un merci particulier à tous ceux qui se sont mobilisés pour m'aider à « doubler les américains » pour mon papier : Marie-May (comment m'as-tu supportée pendant cette période ?), Marie-Pierre, ma première tutrice de stage (5 ans déjà !) et une pyroséquenceuse professionnelle, Loraine, David G, Fabrice, et Pilou (beaucoup trop d'œufs à greffer, le dimanche après-midi, quand il fait 30 degrés...).

Merci à mes co-thésards du début pour tous ces moments de soutien et d'entre-aide : Laura, Amélie, MMC, Céline D, Mélodie et Guillaume : bonne chance pour la suite ! Bonne thèse Marie !

Gabi, dire que c'est à cause de toi que je suis venue ici ! Comment te dire suffisamment merci pour tout ? Je vais devoir te payer des bières ! Sans aucun doute, si je suis arrivée au bout de cette thèse, c'est en grande partie grâce à toi (blablabla...). Sans oublier notre phrase choc : « On va s'en sortir » !

Merci à Véro, Jojo, Sylvie et Patrick A de m'avoir recueillie dans leur bureau de statutaires (avec du chocolat dans les tiroirs !). Merci Isa pour ton soutien et tes conseils. Merci à Bibi et Sophie pour toutes ces commandes de dernières minutes passées avec le sourire.

Spéciale dédicace à toute l'équipe de BioDocs-Lyon, parce qu'il y a un monde en dehors du labo, en dehors de la thèse et en dehors de la recherche académique !

Merci à mes coachs de préparation à la passerelle de médecine : Yohann pour ses lectures et relectures de la lettre de motivation (« c'est quoi ce paragraphe moisi ?! »), Marie M. et Marie C. pour leurs suggestions pertinentes, Cécile pour son partage d'expérience de passerellienne, Yann pour ses discussions enrichissantes sur la médecine, et Denis pour sa vision de médecin.

Un grand merci à mes amis. Ceux avec qui j'ai partagé la galère de la thèse : Lucie, Noé, Soizic, Etienne, Thibaut, Gab, Simon, Julie, ... Et ceux qui sont là depuis longtemps déjà : Sarah, Marie, Mickael, Charlène, la petite Lucie, Myriam, ... et évidemment Jean-Baptiste.

Enfin, merci à mes parents, ma sœur, mon beau-frère, mes neveux, et mes grands-parents (aux vies extraordinaires et inspirantes), soutien indéfectible, et très courageux quand on sait combien je peux être pénible.

Vivement la suite !

Le récepteur à neurotrophine TRKC a été initialement montré comme étant un récepteur à dépendance, puisqu'il est capable d'induire la mort cellulaire par apoptose en l'absence de son ligand, NT-3. Cette mort cellulaire a d'abord été décrite comme étant importante dans la régulation de la survie neuronale, pendant la formation du système nerveux sympathique. Plus tard, elle a été montrée comme étant impliquée dans différents types de cancer. Précédemment au laboratoire, il a été montré que la fonction pro-apoptotique de TRKC est invalidée par une boucle autocrine de production de NT-3, qui peut être ciblée par un agent interférant dans une approche thérapeutique.

Au cours de ma thèse, je me suis attachée à décrire TRKC dans un rôle inhabituel pour un récepteur à tyrosine kinase, celui de suppresseur de tumeur conditionnel dans le cancer colorectal. En effet, j'ai constaté et confirmé une perte de l'expression de TRKC, tant au niveau ARNm que protéique, dans le tissu tumoral par rapport au tissu normal associé. Une analyse de la méthylation des îlots CpG et des histones de la région promotrice de TRKC m'a permis de démontrer qu'une hyperméthylation du promoteur est à l'origine de cette perte d'expression de TRKC dans le tissu tumoral colorectal. Exprimer TRKC de manière ectopique dans des lignées colorectales tumorales m'a permis de démontrer son rôle suppresseur de tumeur *in vitro*, mais aussi *in vivo* dans un modèle de xénogreffes chez le poulet. Cette perte d'expression de TRKC pourrait constituer une potentielle cible thérapeutique, s'il était possible de forcer la réexpression de TRKC afin qu'il exerce son rôle suppresseur de tumeur. Or, dans des lignées tumorales de colon n'exprimant plus TRKC, j'ai pu induire sa réexpression grâce à des traitements avec des inhibiteurs des DNA Méthyl Transferases (DNMTs) et des Histone DeAcetylases (HDACs), des inhibiteurs dont certains sont actuellement utilisés dans des essais cliniques.

Je me suis également intéressée au profil d'expression de TRKC et de son ligand NT-3 dans le cancer du rein. J'ai pu observer que selon le grade tumoral, environ 20% des patients expriment toujours TRKC et sur-expriment NT-3 dans le tissu cancéreux par rapport au tissu normal associé. Comme cela a été montré dans le neuroblastome, cette boucle autocrine de production de NT-3 pourrait être ciblée par des agents interférants afin de bloquer la liaison de NT-3 avec TRKC, et induire l'apoptose des cellules cancéreuses. Ainsi, dans le cadre d'une approche thérapeutique, au moins 20% des patients pourraient bénéficier de cette thérapie ciblée.

Enfin, j'ai pris part à un projet dont l'objectif était la caractérisation moléculaire de la cascade de signalisation conduisant à l'induction de l'apoptose par TRKC. Afin d'induire la mort cellulaire, le domaine intracellulaire de TRKC est clivé par les caspases en deux sites, ce qui entraîne la génération d'un fragment pro-apoptotique, TRKC KF (Killer Fragment). Lors d'un crible double-hybride, COBRA1, un cofacteur de BRCA1, a été identifié comme partenaire potentiel de TRKC KF. Nous avons alors montré que COBRA1 est requis pour la mort cellulaire

induite par TRKC, et que l'apoptose induite par TRKC est dépendante de la voie apoptotique intrinsèque.

Mots-clés : Récepteurs à dépendance, TRKC, cancer colorectal, régulation épigénétique, caspases.

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	4
RÉSUMÉ	5
SOMMAIRE	7
LISTE DES ABBRÉVIATIONS	10
INTRODUCTION	12
I- Le cancer colorectal	12
1- L'épithélium intestinal : du normal au tumoral	12
1.1- Organisation et homéostasie de l'épithélium intestinal normal	12
1.1.1- La muqueuse intestinale : une structure complexe et ordonnée	12
1.1.2- Le maintien de l'homéostasie de l'épithélium	13
1.1.2.a - Cellules souches et apoptose : un équilibre	13
1.1.2.b – Aperçu des voies de signalisation impliquées : WNT, TGFβ et RAS	14
1.2 - La tumorigenèse intestinale	15
1.2.1- L'initiation tumorale	15
1.2.1.a - Le modèle du haut vers le bas	15
1.2.1.b - Le modèle du bas vers le haut	15
1.2.1.c - Une coexistence des deux modèles	16
1.2.2- La progression tumorale	17
1.2.2.a – De la séquence adénome-carcinome à la métastase	17
1.2.2.b - La cellule souche cancéreuse	18
2- Les mécanismes génétiques impliqués dans le cancer colorectal	19
2.1 - Oncogènes, suppresseurs de tumeur et gènes de stabilité du génome	19
2.1.1 – Les oncogènes	19
2.1.2 – Les suppresseurs de tumeurs	20
2.1.3 – Les gènes de stabilité du génome	20
2.2- Instabilité génétique	21
II- La régulation épigénétique	23
1- Généralité : la régulation épigénétique	23
2- Les acteurs principaux de la régulation épigénétique	24
2.1- La structure chromatinienne : un rôle essentiel dans la régulation génique	24
2.1.1 - Une question de structure	24
2.1.2 – Hétérochromatine & Euchromatine	24
2.2 - Les modifications des histones	25
2.2.1 - Les histones, pièces maîtresses de la structure chromatinienne	25
2.2.2 - Un haut lieu des modifications épigénétiques	25
2.3 - Les ARN non-codant	26
2.3.1 - Les ARNnc, de nouveaux acteurs de la régulation épigénétique	26
2.3.2 - Implication des ARNnc dans les processus épigénétiques	26

2.4 - La méthylation de l'ADN	27
2.4.1 - Les mécanismes basiques de la méthylation de l'ADN	27
2.4.1.a – Les DNMTs, au cœur du processus de méthylation	28
2.4.1.b – Une distribution qui ne doit rien au hasard	29
2.4.2 – Le processus de dé-méthylation	30
3 - Les modifications épigénétiques dans les cancers colorectaux	31
3.1- Hyperméthylation des gènes suppresseurs de tumeur	31
3.2- Hypométhylation globale du génome tumoral	32
III- TRKC, un récepteur multi-facettes	34
1- TRKC, un récepteur à neurotrophine	34
1.1 – La théorie neurotrophique	34
1.2 – Les neurotrophines et leurs récepteurs	34
1.3 – Rôle de TRKC dans le développement du système nerveux	35
1.3.1 – Profil d'expression de <i>Nt-3</i> et <i>TrkC</i>	35
1.3.2 – Rôle de TRKC dans la formation des DRGs	36
1.4 – Transduction du signal neurotrophique par les récepteurs TRKs	37
2- TRKC, un récepteur à dépendance	38
2.1 – Le concept des récepteurs à dépendance	38
2.1.1 – Le concept	38
2.1.2 – Une grande famille	38
2.2 – L'apoptose induite par les récepteurs à dépendance	39
2.2.1 - Les différentes voies apoptotiques	39
2.2.1.a – L'apoptose extrinsèque	40
2.2.1.b – L'apoptose intrinsèque (mitochondriale)	40
2.2.2- L'apoptose induite par les récepteurs à dépendance	41
2.3- TRKC, un récepteur à dépendance	42
2.3.1 - TRKC, capable d'induire activement l'apoptose	42
2.3.2 - TRKC, la confirmation venue d'ailleurs	43
IV- TRKC/NT-3, une cible thérapeutique en cancérogenèse	44
1- Implication du couple TRKC/NT-3 dans le neuroblastome	44
2 - Implication du couple TRKC/NT-3 dans le médulloblastome	45
3 - Implication du couple TRKC/NT-3 dans d'autres types de cancer	45
RÉSULTATS	47
1 – Article 1 : Le récepteur à dépendance TRKC est un suppresseur de tumeur potentiel dans le cancer du colon.	49
2 – Article 2 : Le récepteur à dépendance TRKC déclenche l'apoptose par le recrutement de COBRA1 avant d'être transféré à la mitochondrie.	50
3 – Projets en cours	51
3.1 – Profil d'expression de <i>NT-3</i> et <i>TrkC</i>	51
a) Cas du cancer du rein	51
b) Cas du cancer du poumon	53
c) Cas du cancer du sein	54
3.2 – Régulation de l'expression de <i>NT-3</i>	54
3.3 – BAF180, nouveau partenaire potentiel de TRKC KF	56
DISCUSSION & PERSPECTIVES	57

I – TRKC, un récepteur à dépendance : Quelle signification biologique ?	57
1 – Comment le départ du ligand NT-3 peut-il induire l'apoptose ?	57
2 – L'activation des caspases : un évènement initiateur ou exécutif ?	58
2.1 – Le « dépendosome », une plateforme activatrice pour TRKC ?	58
2.2 – L'hypothèse d'une activation locale des caspases	59
3 – TRKC, un inducteur de la mort cellulaire intrinsèque	61
3.1 – La voie mitochondriale : une voie possible d'induction de mort pour les RDs ?	61
3.2 – Quel rôle de TRKC KF dans cette voie de mort intrinsèque ?	62
4 - Nouveaux partenaires et autres rôles potentiels de TRKC KF	62
4.1 – HEY1	63
4.2 – L'importine $\alpha 3$	64
4.3 - BAF180	64
II - Surexpression de NT-3 : un mécanisme tumoral pour échapper à l'apoptose induite par TRKC ?	65
1 – La sur-expression de NT-3, un blocage direct de la voie négative de TRKC : l'exemple du neuroblastome et du cancer du rein	65
2 – La régulation de l'expression de NT-3 : quels mécanismes ?	66
3- Cibler l'interaction NT-3/TRKC : une nouvelle cible thérapeutique	68
III – TRKC, un suppresseur de tumeur conditionnel ?	70
1 – Inhibition de l'expression de TRKC dans le cancer du colon	70
2 – TRKC, victime de la régulation épigénétique	71
2.1 – Une hyperméthylation du promoteur et une perte de l'expression de TRKC	71
2.2 – Le cancer colorectal, un terrain propice à une dérégulation de la régulation épigénétique ?	73
3 – Ré-exprimer le suppresseur de tumeur conditionnel TRKC : Une perspective thérapeutique.	74
CONCLUSION	76

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

AIF	Apoptosis-Inducing Factor
APAF1	Apoptotic protease-activating factor 1
APC	Adenomatosis polyposis coli
APC/C	Anaphase-promoting complex/cyclosome
ASO	Antisense oligonucleotides
ATP	Adenosine-triphosphate
BAD	BCL2-associated agonist of cell death
BAF180	BRG1-associated factor 180
BAK	BCL2-antagonist/killer
BAX	BCL2-associated X protein
Bcl-2	B-cell CLL/lymphoma 2
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
BH3	Bcl-2 homology domain 3
BID	BH3-Interacting Domain death agonist
BiFC	Bimolecular fluorescence complementation
BIM	BCL2-Interacting Mediator of cell death
BRCA1	Breast cancer 1
CARD	Caspase activation and recruitment domain
cIAP	Cellular Inhibitor of Apoptosis
CLL	Chronic lymphoid leukemia
CNS	Central nervous system
Cobra1	Cofactor of BRCA1
CoIP	Co-Immunoprecipitation
CREB	cAMP response element-binding protein
DCC	Deleted in colorectal carcinoma
DISC	Death-Inducing Signaling Complex
DNA	Deoxyribonucleic acid
DNMT	DNA methyltransferase
DP5	Death protein 5
DR	Dependence receptor
DRAL	Down-regulated in Rhabdomyosarcoma LIM-domain protein
DRG	Dorsal root ganglia
DRP1	Dynamin related protein 1
EMT	Epithelial-mesenchymal transition
ERBB4 V-	Erb-a erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 4
ERK	Extracellular-signal-regulated kinase
FADD	FAS-associated protein with a Death Domain
FASL	FAS ligand
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GFP	Green fluorescent protein
GSK-3	Glycogen synthase kinase 3
GTP	Guanosine triphosphate
HDAC	Histone deacetylase
HEK	Human embryonic kidney
Hey1	Hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif 1
HeyL	Hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif-like
HHV-8	Human herpes virus 8

ICD	Intracellular domain
IMS mitochondrial	Inter-Membrane Space mitochondrial
IRS1	Insulin receptor substrate 1
JNK	c-jun N-terminal kinase
KF	Killer fragment
KO	Knock out
LOH	Loss of heterozygosity
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MCL-1	Myeloid cell leukemia sequence 1
MGMT	O-6-methylguanine-DNA methyltransferase
MLK	Mixed-lineage kinase
MOMP	Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization
NALP1	NLR family, pyrin domain containing 1
NF- κ B	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells
NGF	Nerve growth factor
NLS	Nuclear localization signal
NT-3	Neurotrophin-3
NT-4/5	Neurotrophin-4/5
PBRM1	Polybromo 1
PEG	Polyethylene glycerol
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
PIDD	P53-induced death domain protein
PKC	Protein kinase C
PNS	Peripheral nervous system
PTPC	Permeability transition pore complex
qRT-PCR	Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction
RASSF2A	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 2A
RIPK1	Receptor-Interacting Protein Kinase 1
RNA	Ribonucleic acid
RTK	Receptor tyrosine kinase
SCLC	Small cell lung cancer
SNAIL	Snail homolog 1
tBID	Truncated BID
TGF- β	Transforming growth factor- β
TNF α	Tumor necrosis factor α
TRAIL	TNF-related apoptosis inducing ligand
TRAILR	TRAIL receptor
TRK	Tropomyosin receptor kinase
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis
ZEB-2	Zinc finger E-box binding homeobox 2

INTRODUCTION

I- Le cancer colorectal

1- L'épithélium intestinal : du normal au tumoral

L'appareil digestif est un système majeur de l'organisme, responsable de son apport énergétique vital. Les aliments ingérés par la bouche transitent ensuite par l'œsophage vers l'estomac, puis par l'intestin grêle (duodénum, jéjunum et iléon), le colon et enfin le rectum. Tandis que le foie est l'organe majeur de la digestion, c'est au niveau de l'intestin grêle qu'a lieu une absorption massive des nutriments, de l'eau et des électrolytes, tandis que la digestion se poursuit plus lentement. C'est au niveau du côlon que s'achève la phase digestive, avec une formation et un stockage des déchets, favorisés par une réabsorption maximale de l'eau et des électrolytes. Une structure hautement organisée et complexe assure ces fonctions d'absorption, de digestion mais aussi de sécrétion (mucus) : l'épithélium intestinal (Figure 1).

Cet épithélium est constamment exposé à des agressions dues au passage du chyme provoquant des stress mécaniques et chimiques. Pour s'en protéger et conserver l'intégrité de ce tissu, les cellules épithéliales ont une durée de vie limitée, cinq jours en moyenne, ce qui permet un renouvellement régulier de l'épithélium intestinal. Un maintien de l'homéostasie de ce tissu est essentiel pour éviter l'accumulation d'anomalies génétiques et/ou épigénétiques pouvant initier un processus tumoral. Dans les cas de syndromes familiaux de cancer colorectal, des mutations germinales prédisposantes peuvent rompre cet équilibre homéostatique et faciliter l'initiation et/ou la progression d'un processus tumoral.

1.1- Organisation et homéostasie de l'épithélium intestinal normal

1.1.1- La muqueuse intestinale : une structure complexe et ordonnée

La muqueuse intestinale est l'épithélium qui tapisse la lumière de l'intestin grêle et du colon. Il repose sur trois couches tissulaires superposées : la sous-muqueuse, la musculuse et la séreuse. C'est une muqueuse composée d'un épithélium unistratifié s'invaginant dans la *lamina propria* sous-jacente pour former les glandes de Lieberkühn (ou cryptes intestinales), mais s'étirant aussi dans la lumière sous forme de protusions, les villosités intestinales. Ces villosités ne sont pas retrouvées au niveau du colon, la muqueuse colique formant uniquement de cryptes. Un important réseau de capillaires veineux et lymphatiques, situé dans la *lamina propria* et accolé à l'épithélium villositaire, permet les échanges entre le bol alimentaire dans la lumière intestinale et

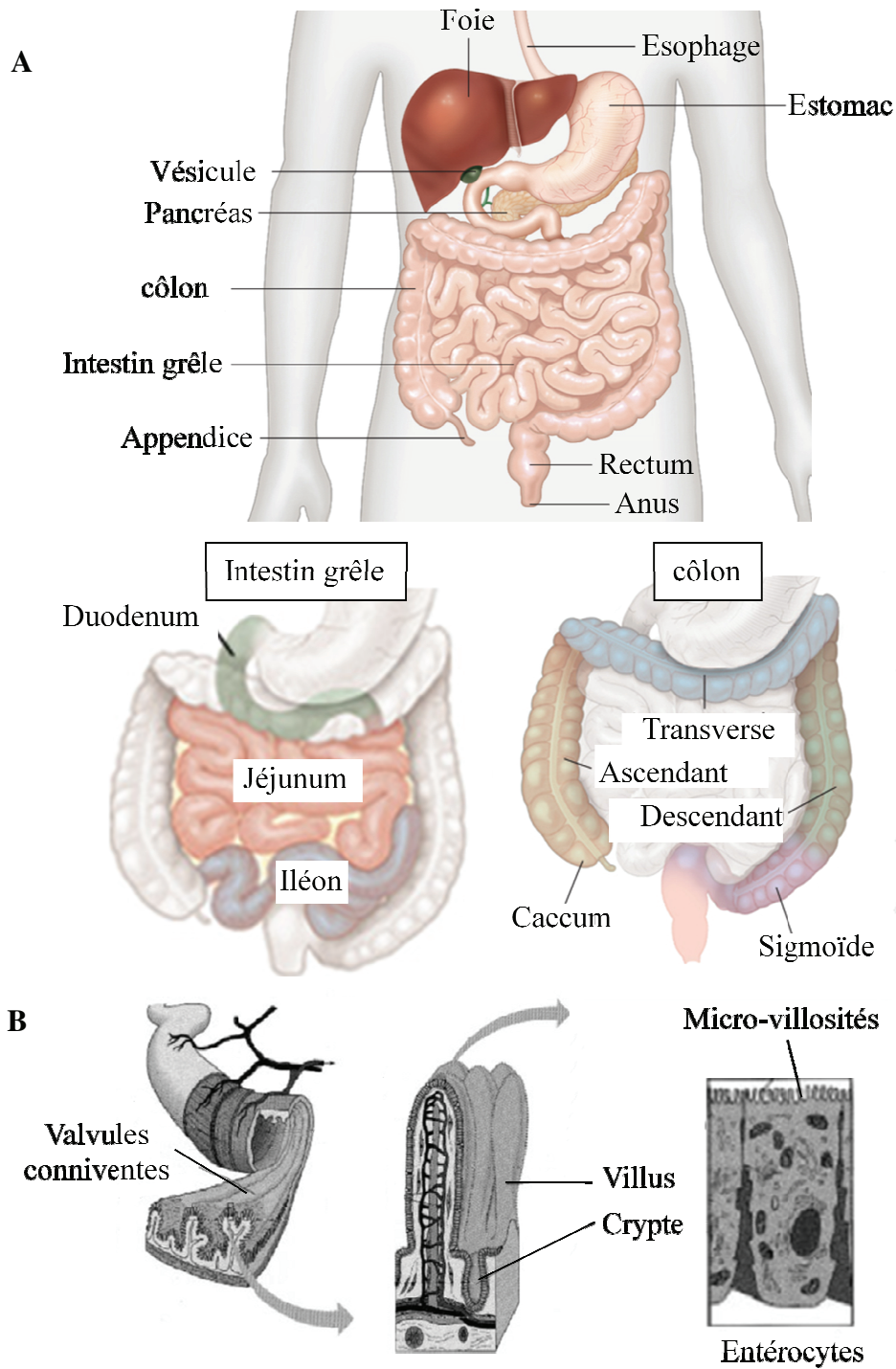


Figure 1: Anatomie du tube digestif humain.

A. L'intestin est divisé en deux parties, l'intestin grêle et le côlon. Au niveau du grêle on retrouve successivement le duodénum, le jéjunum et l'iléon. Le côlon est également divisé en plusieurs segments, le caecum, puis les côlons ascendant, transverse, descendant et sigmoïde.

B. Les différents niveaux de repliement de l'intestin offrent une surface d'échange optimale.

(d'après Encyclopedia Britannica ; Marieb 1999)

l'organisme. Cette circulation veineuse est ensuite drainée par les veines mésentériques et le système porte vers le foie (Figure 2).

D'une surface avoisinant les 200 m², l'épithélium intestinal et colique est en continuel renouvellement. Ainsi les cellules épithéliales exposées aux agressions mécaniques et chimiques du contenu intestinal sont régulièrement et rapidement remplacées. Ce renouvellement cellulaire est assuré par la prolifération des cellules souches situées au fond des cryptes (Potten et al., 1997). La découverte de marqueurs tels que Lgr5, CD133 (ou PROM1 ou prominin-1) et BMI1 (B lymphoma Mo-MLV insertion region 1 homolog), spécifiques des cellules souches (Barker N. et al. 2009 ; Sangiorgi & Capecchi 2008 ; Zhu et al., 2009) a permis de préciser la localisation de la niche des cellules souches intestinales. Il a ainsi été montré que les cellules souches s'intercalent au fond des cryptes intestinales entre les cellules de Paneth (Sato et al. 2011). Ces cellules sécrétrices (lysozyme, criptidines, défensines) semblent créer un environnement favorable au maintien des cellules souches au niveau des cryptes intestinales. Indifférenciées, les cellules souches perdurent tout au long de la vie de l'organisme et sont capables de produire tous les types cellulaires intestinaux, en fonction du programme de différenciation qu'elles activent, de s'auto-renouveler et de se régénérer suite à une agression (Leedham et al., 2005).

1.1.2- Le maintien de l'homéostasie de l'épithélium

1.1.2.a - Cellules souches et apoptose : un équilibre

Ces cellules souches se divisent lentement pour donner des cellules progénitrices qui, elles, se divisent rapidement (toutes les 12-16h) et forment un compartiment cellulaire dit « d'amplification », sous le contrôle des voies de signalisation WNT et NOTCH. Ces cellules vont ensuite migrer selon l'axe baso-apical et se différencier simultanément en quatre types cellulaires : les cellules absorbives, calciformes, entéro-endocrine et de Paneth. La différenciation et l'arrêt du cycle cellulaire s'opèrent quand les cellules passent la limite crypte/villosité pour l'intestin grêle, ou le second tiers de la crypte colique. Les cellules absorbives (entérocytes dans l'intestin grêle ou colonocytes dans le colon) sont majoritaires et permettent l'absorption des nutriments de la lumière intestinale et leur acheminement vers les capillaires sanguins. Ces cellules présentent une forte polarité associée à de nombreuses villosités qui augmentent considérablement leur surface d'absorption apicale, faisant face à la lumière intestinale : on parle de bordure en brosse. Les cellules calciformes, plus nombreuses dans le colon, sont insérées entre les cellules absorbives et sécrètent le mucus nécessaire au déplacement et à la diffusion du bol alimentaire, et qui protège la muqueuse des dommages mécaniques et chimiques. Les cellules entéro-endocrines sécrètent les hormones telles que la sérotonine, la substance P et la sécrétine, permettant la régulation de la sécrétion des enzymes digestives, de la bile et des sucs excrétés vers l'intestin par le pancréas et le foie (pour revue, Sancho et al., 2004) (Figure 3).

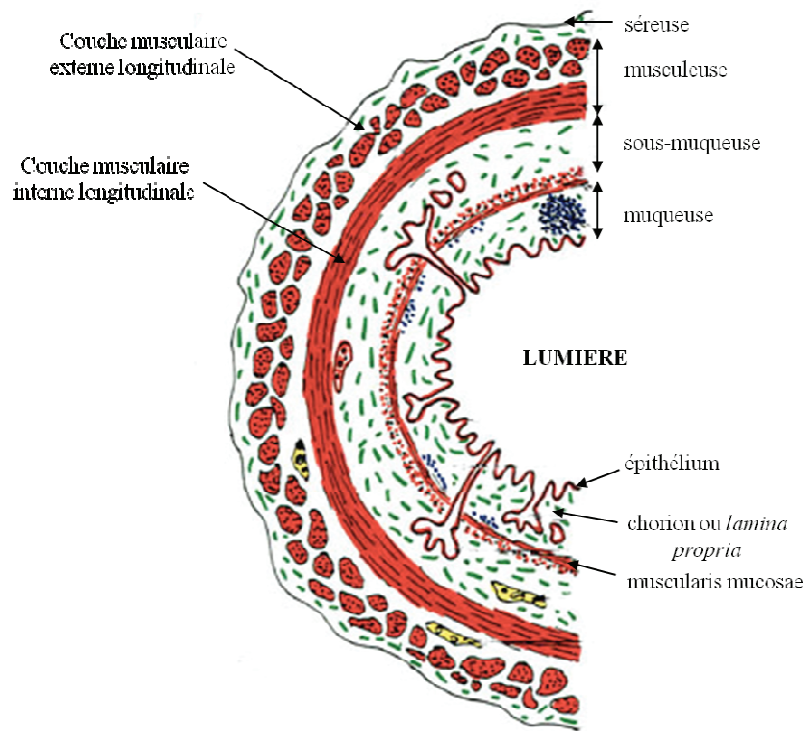


Figure 2 : Organisation de l'intestin.

L'intestin est constitué de quatre couches tissulaires avec de l'extérieur vers la lumière intestinale : (i) la séreuse, feuillet viscéral du péritoine, (ii) la musculuse, une double couche de muscle lisse qui exécute le péristaltisme du TD, (iii) la sous-muqueuse conjonctivo-vasculaire et (iv) la muqueuse intestinale, un épithélium unistratifié qui s'invagine dans la *lamina propria*, chorion conjonctivo-vasculaire, pour former des cryptes et des villosités. La lame basale sur laquelle est ancré l'épithélium n'est pas représentée. La *muscularis mucosae* est la musculuse de la muqueuse intestinale.

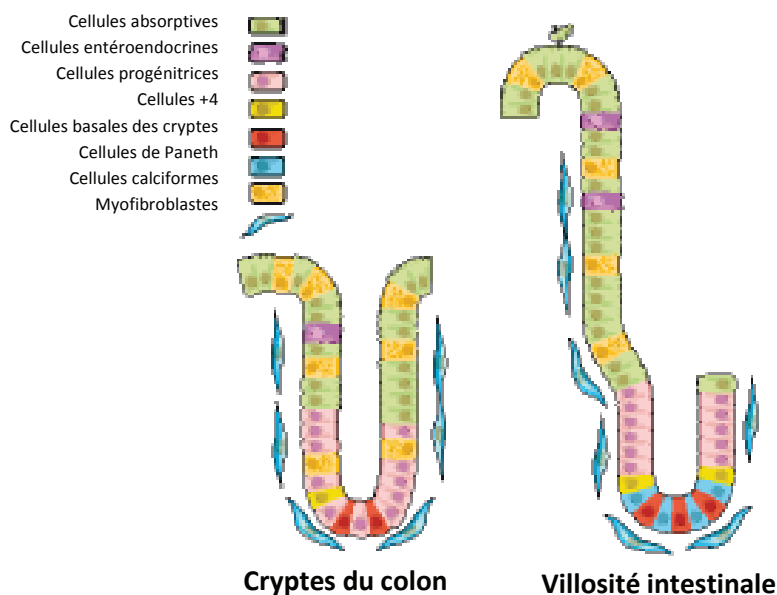


Figure 3 : Organisation des cellules souches au niveau des cryptes coliques et des villosités intestinales.

Ces deux régions possèdent un compartiment de cellules souches à la base des cryptes. Les cellules basales des cryptes et les cellules souches en position +4 ont été décrites pour être présentes entre ou juste au dessus des cellules de Paneth. Il est à noter que les cellules de Paneth n'existent pas au niveau des cryptes coliques, mais des cellules similaires ont été identifiées. Les autres lignages – entérocytes, cellules de Paneth, cellules calciformes et entéroendocrines – sont présentes à des taux différents mais fixes.

(Figure adaptée de Medema & Vermeulen, 2011)

Les cellules épithéliales différenciées vont ensuite atteindre le sommet de la villosité ou de la crypte, où elles seront détruites par apoptose et seront exfoliées dans la lumière intestinale. C'est sur ce processus que repose le maintien de l'homéostasie de l'épithélium. En effet, le nombre de cellules de l'épithélium intestinal doit rester constant afin d'éviter le développement d'anomalies bénignes et l'initiation d'un processus tumoral. Le nombre de cellules produites au niveau des cryptes est donc strictement contrebalancé par le nombre de cellules éliminées par apoptose.

1.1.2.b – Aperçu des voies de signalisation impliquées : WNT, TGFβ et RAS

Pour permettre l'homéostasie épithéliale, de nombreuses voies de signalisation sont impliquées, comme celles de morphogènes tels que WNT ou BMP. L'environnement mésenchymateux et les interactions avec la matrice sont également impliqués dans le maintien de l'homéostasie (Medema & Vermeulen 2011). L'ensemble des événements permettant le maintien de l'intégrité des parois intestinales est particulièrement complexe et difficile à appréhender dans son ensemble avec les modèles *in vitro*.

La voie de signalisation WNT contrôle la formation et la maturation de l'endoderme embryonnaire qui formera l'intestin. Chez l'adulte, elle est essentielle à la prolifération des cellules progénitrices de la crypte, à leur différenciation vers les différents lignages cellulaires, et à l'agencement des cellules, de la crypte au sommet des villosités. La voie Wnt participe donc au maintien de l'homéostasie intestinale (Gregorieff & Clevers 2005; Korinek et al. 1998) (Figure 4).

Les protéines BMPs et les membres de la voie TGFβ font parties d'une même famille. Très présente au niveau de l'épithélium intestinal, la voie TGFβ pourrait réguler en partie l'homéostasie en empêchant une prolifération cellulaire aberrante et/ou en activant l'apoptose (pour revue, Sancho et al., 2004). Les BMPs, exprimées par les cellules du mésenchyme, stopperaient la prolifération cellulaire à la frontière entre les cryptes et les villosités, permettant ainsi la différenciation (Medema & Vermeulen 2011).

Les protéines RAS sont très fréquemment mutées dans les cancers colorectaux, ce qui témoigne de leur importance dans les signalisations mise en œuvre dans l'intestin. L'activation des MAPKs, effecteurs de cette voie, est uniquement détectée dans les cellules prolifératrices indifférenciées des cryptes, dont elle pourrait contrôler la prolifération (Aliaga et al., 1999).

Les voies de signalisation mises en jeu dans le maintien de l'homéostasie de l'épithélium intestinal sont bien plus nombreuses que les trois citées ci-dessus, et interconnectées entre elles, sans oublier que le contexte cellulaire environnant peut également jouer un rôle (Guo & Wang 2009; Medema & Vermeulen 2011). C'est une dérégulation d'une ou plusieurs de ces voies qui va rompre l'équilibre homéostatique et conduire à la tumorigenèse intestinale.

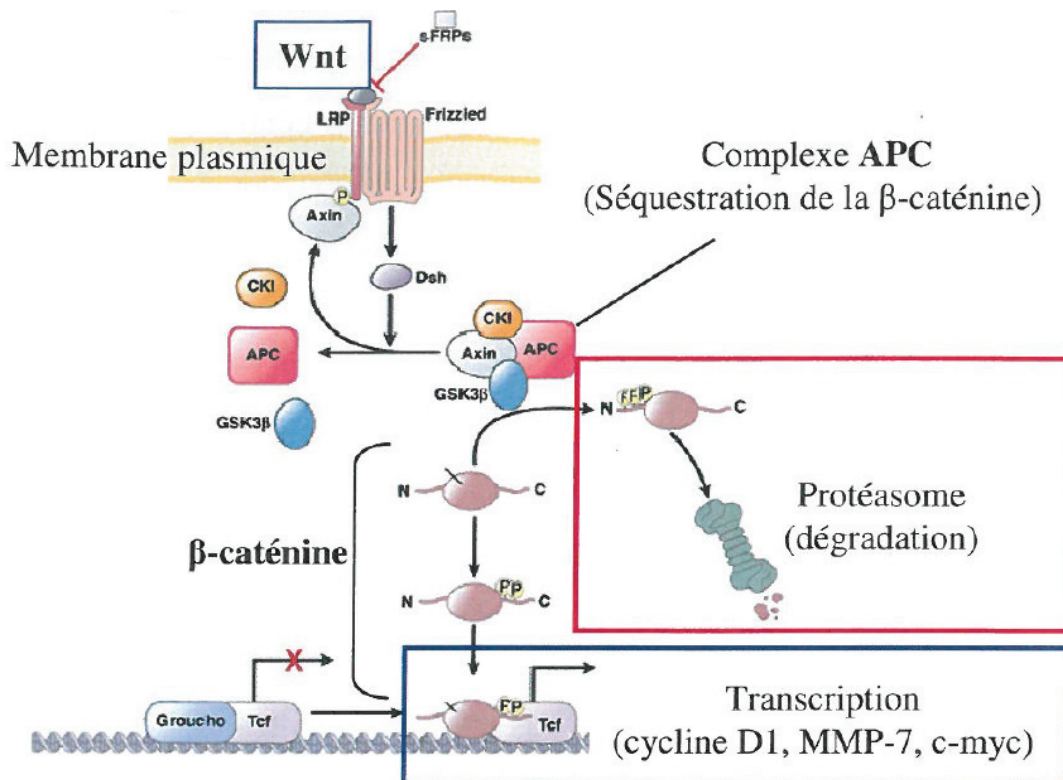


Figure 4 : Signalisation de la voie canonique Wnt/β-caténine.

Les WNTs sont des protéines diffusibles qui activent les récepteurs Frizzled exprimés à la membrane plasmique. Quand la voie Wnt est activée, le complexe APC séquestre la β-caténine cytoplasmique et conduit à sa dégradation au niveau du protéasome. Lorsque les récepteurs sont activés, le complexe APC est dissocié et la β-caténine s'associe avec le facteur de transcription TCF/LEF dans le noyau, où ils régulent l'activité génique.

(Figure adaptée de Scoville, 2008)

1.2 - La tumorigenèse intestinale

En dehors de toute prédisposition génétique, le risque de développer un adénome augmente avec l'âge. Dans les pays industrialisés, il est estimé à 7% pour une population de 45 à 65 ans, et environ 50% au-delà. Ces adénomes n'évoluent pas forcément en cancers colorectaux.

La grande majorité des cancers colorectaux se développe à partir de la transformation de cellules épithéliales intestinales, qui entraîne la formation de foyers de cryptes aberrantes (ACF). Les foyers de cryptes aberrantes, de formes irrégulières, sont bordés par un épithélium altéré, allant de l'hyperplasie à la dysplasie. Ces cryptes peuvent se transformer en adénomes (ou polypes adénomateux qui conduisent à des saignements et des obstructions du tube digestif), lésions bénignes qui peuvent évoluer en adénocarcinomes, lésions malignes, qui sont des formes invasives de tumeurs pouvant métastaser.

1.2.1- L'initiation tumorale

1.2.1.a - Le modèle du haut vers le bas

Ce premier modèle fut proposé par B.Volgestein, et décrit un développement tumoral du haut de la crypte vers le bas. Les arguments en faveur du modèle du haut vers le bas sont principalement issus d'observations histo-pathologiques. En effet, ce modèle provient de l'étude d'adénomes sporadiques précoces et a été établi après l'analyse du profil d'altération d'une voie de signalisation impliquée dans les stades précoces des cancers colorectaux : la signalisation Wnt. Un des gènes impliqués dans cette voie est celui du suppresseur de tumeur APC (Adenomatous Polyposis Coli). Aucune altération de ce gène n'a été observée dans les cellules de la crypte en dessous de la lésion, mais plutôt une augmentation de la prolifération ainsi qu'une dérégulation de la voie Wnt au niveau de l'épithélium de surface, au dessus de la lésion. L'équipe de B.Volgestein postule alors que les cellules mutées seraient localisées à la surface de l'épithélium colique au niveau de la zone inter-cryptique, et la lésion s'étendrait ensuite latéralement et vers le bas pour former de nouvelles cryptes aberrantes (Shih et al., 2001) ([Figure 5](#)).

1.2.1.b - Le modèle du bas vers le haut

Quelques années après la publication des travaux de l'équipe de Bert Vogelstein, le groupe de Nicholas A. Wright proposa une autre théorie, celle du bas vers le haut (Preston et al., 2003). Cette théorie alternative repose sur l'étude des adénomes unicryptes, retrouvés dans le syndrome

de polypose familiale, et qui seraient des lésions plus précoces que les adénomes sporadiques. Ainsi, dans les cellules dysplasiques de l'adénome, la voie WNT apparaît dérégulée à la base des cryptes adjacentes mais pas dans les cellules situées à la surface de l'adénome. Dans ce modèle, la cellule mutée proliférerait et cette population clonale coloniserait ensuite toute la crypte du bas vers le haut. La lésion pourrait alors s'étendre en créant de nouvelles cryptes aberrantes par fission cryptique symétrique (Figure 5).

Ce modèle du bas vers le haut est en accord avec l'hypothèse de l'implication des cellules souches dans le processus tumoral. En effet, les cellules souches, localisées au fond des cryptes coliques et intestinales, par leur capacité d'auto-renouvellement et leur longue durée de vie, apparaissent plus propices à l'initiation d'un processus tumoral que les cellules différenciées, rapidement renouvelées. Une cellule épithéliale différenciée acquérant une mutation oncogénique sera rapidement éliminée et ne pourra donc pas entraîner de dommages néoplasiques. En revanche, si des mutations oncogéniques surviennent au niveau des cellules souches perdurant dans le temps, elles peuvent le transmettre aux cellules filles. Un développement néoplasique pourrait alors survenir et rompre l'homéostasie de l'épithélium intestinal, donnant lieu à la formation d'un foyer de crypte aberrant. De cette constatation est née la théorie de l'implication des cellules souches dans la tumorigenèse colorectale (McDonald et al. 2006).

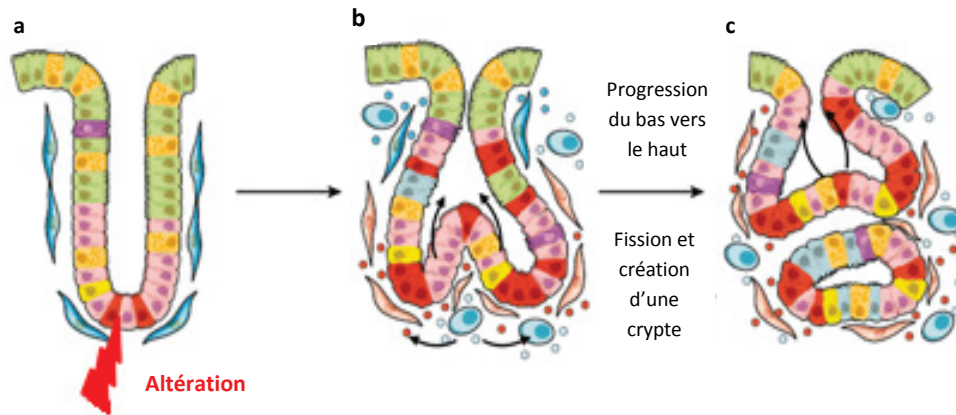
1.2.1.c - Une coexistence des deux modèles

Ces deux modèles de tumorigenèse colorectale peuvent-ils coexister ? Il semblerait que oui. Dans les adénomes les plus avancés, il a été observé que les cellules dysplasiques de surface pouvaient repousser progressivement les cellules épithéliales normales de la crypte, entraînant une progression du haut vers le bas. On peut alors imaginer que l'initiation tumorale débiterait au niveau des cellules souches, c'est-à-dire selon le modèle du bas vers le haut, puis, dès que la lésion atteindrait un stade plus avancé, l'envahissement se poursuivrait du haut vers le bas (Preston et al., 2003).

Bien que les cellules souches soient des candidats privilégiés comme cibles de l'initiation tumorale du fait de leurs capacités inhérentes particulières, on sait maintenant que n'importe quelle cellule de l'architecture du tissu peut acquérir un programme de dé-différenciation et d'auto-renouvellement, et ainsi devenir une cellule susceptible d'initier une tumeur (Visvader, 2011).

La séquence des événements ayant lieu au moment de l'initiation d'un adénome colorectal est donc toujours soumise à débat. Une étude récente a montré que dès les stades très précoces, les micro-adénomes sont déjà polyclonaux. Une analyse de la phylogénie de ces tumeurs montre des mutations hétérotypiques, témoignant d'une évolution indépendante des clones. Ainsi le processus d'initiation tumorale semble être bien plus complexe que ce qui était initialement pensé, à savoir qu'une seule cellule était à l'origine d'une tumeur (Thirlwell et al., 2010).

Modèle du bas vers le haut



Modèle du haut vers le bas

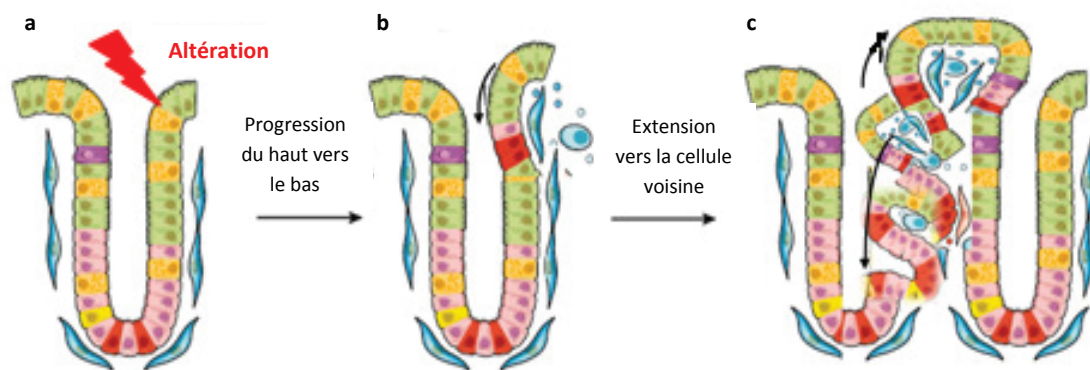


Figure 5 : Modèles de l'initiation des adénomes coliques.

Deux modèles sont avancés pour expliquer l'initiation d'un adénome.

Le modèle du bas vers le haut postule que la lésion serait initiée au niveau d'une cellule souche au fond d'une crypte. Cette cellule dysplasique proliférerait et ainsi coloniserait toute la crypte. La lésion s'étendrait ensuite par fission de la crypte aberrante (Preston et al., 2003).

Le modèle du haut vers le bas postule quant à lui que la lésion serait initiée à partir d'une cellule dysplasique au niveau de l'épithélium de surface, et après avoir acquis des propriétés de cellules souches, elle proliférerait ensuite vers le fond de la crypte, déplaçant les cellules épithéliales normales et s'étendant ensuite aux cryptes voisines (Shi et al., 2001).

(Figure adaptée de Medema & Vermeulen, 2011)

1.2.2- La progression tumorale

1.2.2.a – De la séquence adénome-carcinome à la métastase

Un adénome est une lésion bénigne due à l'hyper-prolifération et l'accumulation des cellules épithéliales des cryptes de Lieberkühn, dans et au-dessus de la muqueuse. On distingue trois phases successives dans l'évolution du clone néoplasique : précoce (ou léger), intermédiaire (ou modéré) et avancé (ou sévère), en fonction des caractères dysplasiques des lésions, établis selon des critères cellulaires et architecturaux. La classification histologique ne reconnaît quant à elle que deux stades : le bas grade et le haut grade.

Macroscopiquement un adénome peut être sessile (plan) ou pédiculé (en forme de champignon), et leur architecture peut être de type vilieux, tubuleux ou tubulo-vilieux. Chez l'Homme, leur taille varie de quelques millimètres à plusieurs centimètres. Le risque d'évolution des adénomes en cancers dépend à la fois de la taille des lésions, de leur architecture, de leur nombre et du degré de dysplasie épithéliale (Rubio, 2004).

La durée de la séquence adénome-carcinome est très difficile à définir, et probablement très variable ; la durée moyenne est estimée entre 10 et 20 ans. Histologiquement, la majorité des tumeurs malignes du colon dérivent d'adénomes. Mais d'autres voies de carcinogenèse pourraient exister ; il a été suggéré qu'une instabilité micro-satellitaire pourrait favoriser le développement d'un adénocarcinome à partir d'une forme particulière d'adénome, les adénomes dits « festonnés », caractérisés par des glandes d'architecture dentelée ou festonnée. De plus, il existe aussi des tumeurs malignes *de novo*, apparaissant sans être précédées par une tumeur bénigne détectable (Mueller et al., 2002).

L'étape de transformation de l'adénome vers l'adénocarcinome se définit par l'effraction de la lame basale qui entoure la partie glandulaire de l'intestin, accompagnée par l'invasion de la *lamina propria*. L'adénocarcinome, d'abord superficiel, envahit ensuite la musculaire, et gagne progressivement en profondeur dans la paroi colique, vers la circulation sanguine, les chaînes lymphatiques et les organes voisins (ex : le foie) (Figure 6).

L'invasion de foyers secondaires par les cellules tumorales est responsable de plus de 90% de la mortalité due au cancer. Les métastases sont le fruit de la propagation de cellules tumorales à partir d'un site primaire de tumorigenèse, vers des organes distants où elles formeront un foyer secondaire. La présence de métastases impacte sévèrement le pronostic de survie des patients. Le processus par lequel les cellules tumorales quittent le foyer primaire, traversent la lame basale et entrent dans les systèmes circulatoires sanguin et/ou lymphatique, est appelé l'« intravasation », favorisée par la néo-vascularisation des tumeurs (Chambers, 2002) (Figure 7).

Dans le cadre du cancer colorectal, on retrouve des métastases principalement au niveau du foie, du fait de la physiologie du système porte, et des poumons. Toutefois, toutes les cellules d'une tumeur n'ont pas la capacité de métastaser. Dans les tumeurs d'origine épithéliale, comme

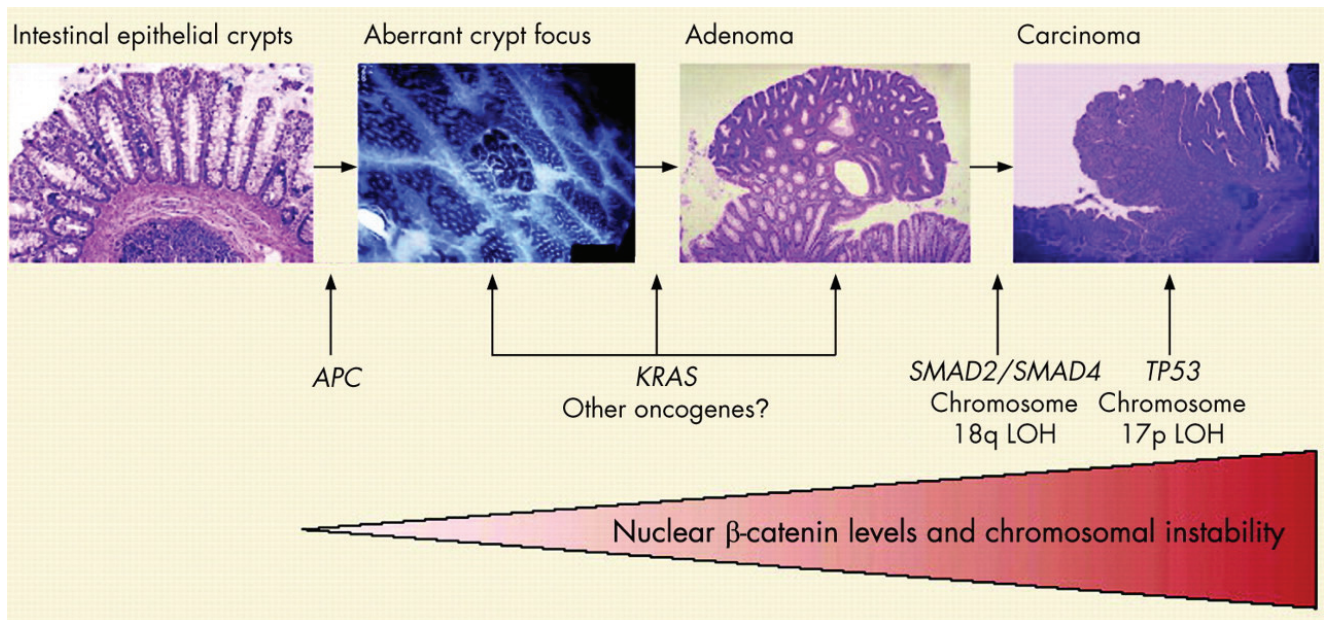


Figure 6 : La séquence Adénome-Carcinome, modèle multi-étapes de la tumorigénèse colorectale

Au moins quatre altérations génétiques sont depuis longtemps décrites pour être impliquées dans le développement d'un cancer colorectal. Les foyers de cryptes aberrantes ont des formes irrégulières et sont bordées par un épithélium altéré, allant de l'hyperplasie (prolifération anormalement élevée) à la dysplasie (prolifération de cellules génétiquement transformées). Les adénomes ou polypes adénomateux sont le plus souvent bénins mais peuvent conduire à des saignements et des obstructions du tube digestif, puis dégénérer en tumeurs malignes. Les adénomes sont classés en bas et hauts grades, selon le caractère de dysplasie des lésions établi sur des critères cellulaires et architecturaux.

(D'après le modèle de Bert Vogelstein)

c'est le cas pour le cancer du colon, la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) est un évènement crucial dans le processus métastatique (Thiery 2002; Thompson & Haviv 2011). L'EMT serait contrôlée par les signalisations de WNT et du TGF β , qui sont toutes les deux activées de manière aberrante au cours de la progression tumorale. Une étude suggère même qu'il pourrait y avoir un lien direct entre l'EMT et l'acquisition de propriétés spécifiques des cellules souches (Valsesia-Wittmann et al., 2004). Ainsi, les cellules subissant l'EMT pourraient être des précurseurs des cellules cancéreuses métastatiques, y compris les cellules souches.

1.2.2.b - La cellule souche cancéreuse

L'hypothèse de la cellule souche cancéreuse est un modèle qui permet d'expliquer l'hétérogénéité qui est communément observée dans les tumeurs solides, tel que le cancer colorectal, où les tumeurs sont très hétérogènes, tant au niveau génétique que cellulaire. Ce modèle propose une organisation hiérarchique des cellules de la tumeur, dans laquelle une sous-population de cellules, avec des caractéristiques proches de celles des cellules souches, serait responsable du maintien de la croissance tumorale (Visvader and Lindeman, 2008). Il a été suggéré que les cellules souches cancéreuses incarneraient « la force motrice » des tumeurs, en préservant leur capacité d'auto-renouvellement, d'expansion et de différenciation. Néanmoins, de nombreux désaccords existent concernant l'existence et l'importance de ces cellules souches dans les tumeurs humaines, probablement à cause du manque de marqueur unique qui permettrait d'identifier directement ces cellules, sans avoir besoin de procéder à des tests fonctionnels consistant en de multiples transplantations (Medema and Vermeulen, 2011). Les cellules souches cancéreuses (CSC) ne sont pas forcément issues de la transformation d'une cellule souche normale, elles peuvent provenir de cellules progénitrices ou de cellules plus différenciées qui auraient acquis la faculté de s'auto-renouveler.

Le concept des cellules souches cancéreuses a une implication clinique directe : ces cellules ont été montrées comme ayant une résistance accrue à l'apoptose et comme étant plus résistantes aux chimiothérapies et radiothérapies. C'est pourquoi ces cellules, qui pourraient être la source de tumeurs récidivistes, sont des cibles cruciales pour le développement de nouvelles thérapies (Todaro et al. 2010; Todaro et al. 2007).

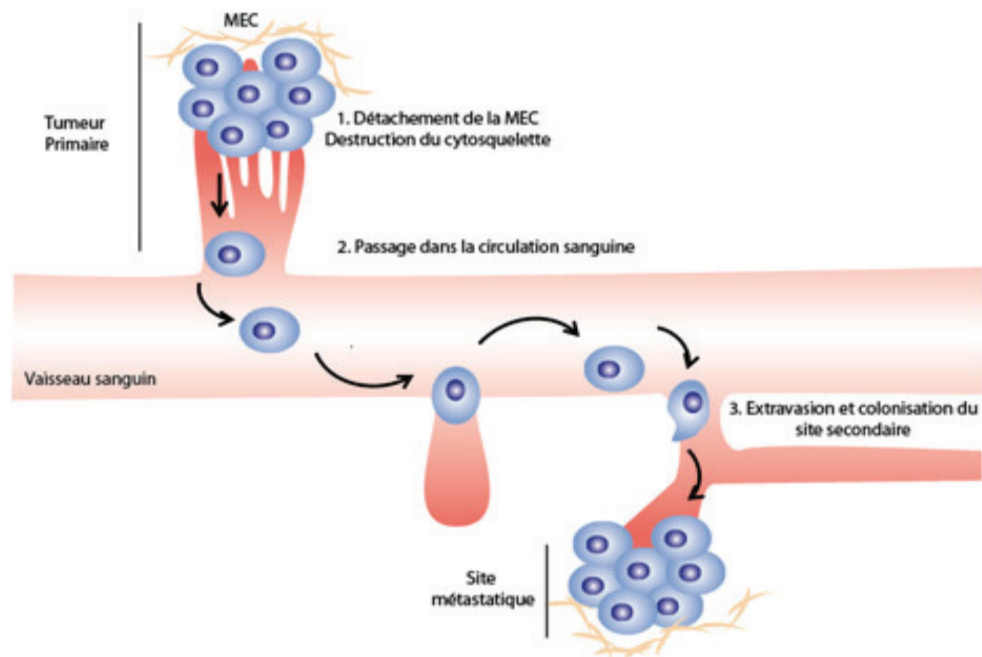


Figure 7 : Le processus métastatique colorectal.

La formation de métastases est un processus multi-étapes, seules les cellules tumorales capables d'accomplir ces étapes pourront permettre le développement de macro-métastases. Au site tumoral primaire, les cellules malignes colorectales doivent (1) se détacher de la matrice extra-cellulaire (MEC), puis après intravasation, (2) passer dans la circulation sanguine directement ou indirectement *via* les vaisseaux et ganglions lymphatiques. Ces cellules circulent et sont arrêtées dans les capillaires hépatiques (3), desquels elles doivent sortir pour initier le développement de micro-métastases puis de macro-métastases au niveau de cet organe secondaire. Les cellules tumorales capables de traverser les capillaires hépatiques rejoignent ensuite la circulation veineuse vers le cœur et le poumon, et peuvent ainsi permettre la formation de métastases pulmonaires.

2- Les mécanismes génétiques impliqués dans le cancer colorectal

Les cancers colorectaux, comme les autres cancers, dérivent de l'altération de gènes impliqués dans des processus régulant la prolifération, la différenciation, et la mort des cellules, mais aussi dans le maintien de l'intégrité du génome. Le modèle du cancer colorectal est particulièrement intéressant car l'analyse des tumeurs, nombreuses et accessibles, a permis d'établir une séquence récurrente d'événements génétiques somatiques nécessaires à la progression tumorale. La découverte de cette séquence d'événements somatiques a permis d'identifier des gènes essentiels au processus cancéreux : les gènes suppresseurs de tumeurs et les proto-oncogènes. Les altérations dans ces deux types de gènes contribuent à donner des avantages prolifératifs aux cellules induisant un phénotype cancéreux (Fearon & Vogelstein 1990; Gryfe 1997).

2.1 - Oncogènes, suppresseurs de tumeur et gènes de stabilité du génome

2.1.1 – Les oncogènes

Les oncogènes dérivent de l'altération de gènes cellulaires : les proto-oncogènes. Une mutation de ces proto-oncogènes peut entraîner un gain de fonction en faveur de la survie ou de la prolifération cellulaire, constituant un avantage sélectif de croissance pour la cellule. Ces altérations peuvent avoir pour conséquence l'activation constitutive des proto-oncogènes, qu'on appelle alors des oncogènes. L'activation de ces proto-oncogènes peut être induite par des translocations chromosomiques, des amplifications géniques, ou des mutations intra-géniques. Une mutation activatrice somatique sur un allèle d'un proto-oncogène est essentielle à l'initiation d'un processus tumoral.

Un des proto-oncogènes fréquemment suractivé dans les cancers colorectaux est K-ras, qui appartient à la voie de signalisation des MAPKs, impliquée dans la régulation de la prolifération cellulaire. K-ras est muté dans plus de 50% des cancers colorectaux (Rajasekharan & Kennedy 2009; Vogelstein et al., 1988), et son altération entraîne une sur-activation de sa signalisation, conduisant à une prolifération anormale des cellules épithéliales de l'intestin (Schubbert et al., 2007).

2.1.2 – Les suppresseurs de tumeurs

On classe les gènes suppresseurs de tumeurs selon deux catégories : les gènes « caretaker » (surveillant), qui maintiennent l'intégrité du génome, et les gènes « gatekeeper » (gardien), qui peuvent induire l'arrêt du cycle cellulaire ou l'apoptose des cellules (Van Heemst et al., 2007). Ainsi, contrairement aux oncogènes, les gènes suppresseur de tumeurs permettent de limiter la prolifération et la différenciation anormale des cellules. Une inactivation de ces gènes constitue donc un avantage sélectif en termes de prolifération et de survie cellulaire.

D'après l'hypothèse des « deux évènements » proposée par Knudson en 1971 (Knudson, 1971), les deux allèles d'un gène suppresseur de tumeurs doivent être inactivés pour permettre une croissance tumorale, alors que les proto-oncogènes n'ont besoin que d'un évènement pour altérer leur fonction normale. Cette inactivation peut être due à des phénomènes génétiques tels que des mutations (faux sens et non sens), ou la perte physique d'un segment chromosomique portant un allèle (on parle de perte d'hétérozygotie (LOH, Loss Of Heterozygosity), ou due à des phénomènes épigénétiques conduisant à une inactivation transcriptionnelle du gène par modifications biochimiques de l'ADN (hyperméthylation du promoteur) ou des protéines histones associées.

Cependant la théorie de Knudson n'est pas universelle, et il a depuis été mis en évidence que pour certains gènes suppresseurs de tumeurs, l'altération d'un seul allèle est suffisante pour contribuer au processus tumoral. Dans ce cas, la quantité de protéine fonctionnelle peut être réduite via un effet-dose appelé haplo-insuffisance, ou son activité inhibée par un dominant négatif produit par l'allèle altéré (Berger & Pandolfi 2011; Santarosa & Ashworth 2004).

Dans tous les cas, des individus déjà porteurs d'une mutation germinale sur un allèle d'un gène suppresseur de tumeur sont prédisposés à l'apparition d'un cancer.

2.1.3 – Les gènes de stabilité du génome

Les gènes de stabilité permettent de préserver l'intégrité du génome ; ce sont par exemple des gènes impliqués dans le contrôle de la fidélité de réplication et la réparation de l'ADN, ou dans la ségrégation des chromosomes pendant la mitose. Leur altération peut générer une instabilité du génome propice à l'apparition de mutations sur des proto-oncogènes ou des gènes suppresseur de tumeur, et ainsi favoriser un développement tumoral. De manière générale, la perte des deux allèles d'un gène de stabilité du génome est requise pour qu'un effet physiologique apparaisse. Cependant, des cas d'haplo-insuffisance ont également été relevés (Berger & Pandolfi 2011; Santarosa & Ashworth 2004).

Dans le cadre du cancer colorectal, l'altération somatique ou germinale des gènes de stabilité du génome la plus connue est celle du système de réparation des mésappariements, contrôlé par les gènes MMR (MisMatch Repair). La mutation de ces gènes entraîne une instabilité du génome, notamment au niveau des microsatellites (Grady & Carethers, 2008).

2.2- Instabilité génétique

L'instabilité génétique est retrouvée dans la plupart des cancers, et en particulier dans les cancers colorectaux. Ce processus conduit à une instabilité du génome, à l'échelle nucléotidique en générant un nombre élevé de mutations ponctuelles non réparées, et à l'échelle chromosomique, en générant des remaniements importants de portions chromosomiques. La perte de la stabilité du génome apparaît comme un processus clé qui permettrait la création d'un environnement génétique propice à l'altération des gènes suppresseurs et des oncogènes, phénomène entraînant la transition adénome-carcinome.

Le système MMR permet de réparer les erreurs introduites par les polymérases lors de la réplication. La défaillance de ce système conduit à un taux élevé de mutations ponctuelles appelé « phénotype mutator » et à une instabilité microsatellitaire (MSI, MicroSatellite Instability) due à une extension de ces répétitions déjà existantes. Le phénotype mutator entraîne l'activation d'oncogènes et/ou l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeur. Les gènes cibles altérés possèdent le plus souvent dans leur séquence codante de courtes répétitions ; c'est le cas des gènes suppresseurs de tumeurs Bax et Tgf β -RII ou de l'oncogène B-raf (Markowitz et al., 1995; Rampino et al., 1997).

L'instabilité génétique dite chromosomique (CIN, Chromosomic INstability) est retrouvée dans 85% des cancers colorectaux. Cette CIN peut générer des cellules avec un nombre aberrant de chromosomes, on parle d'aneuploïdie. Bien que cette observation ait été faite il y a longtemps, il n'a pas encore été défini si elle est une cause ou une conséquence du cancer (Gordon et al., 2012 ; Holland & Cleaveland, 2009 ; Weaver & Cleveland, 2006, 2008, 2009). Elle correspond à une augmentation du taux d'anomalies chromosomiques, c'est-à-dire la perte ou le gain de chromosomes entiers ou de portions chromosomiques. Ces anomalies peuvent être structurales (translocations, LOH) ou numériques (polyploïdie, aneuploïdie) (Lengauer et al., 1997). On observe des signes d'instabilité chromosomique dès la formation des adénomes précoces, qui tendent à s'amplifier tout au long de la séquence adénome-carcinome. Ce processus favorise l'acquisition de nouvelles altérations au niveau des oncogènes et des suppresseurs de tumeur (Grady, 2004 ; Michor et al., 2004), qui seront ensuite sélectionnées durant l'expansion tumorale clonale. Les mécanismes conduisant à cette instabilité chromosomique proviendraient de défauts dans la ségrégation des chromosomes au cours de la mitose, et de dysfonctionnements du système de réparation et de vérification de l'ADN (Caldwell & Kaplan, 2009 ; Nyberg et al., 2002 ; Shiloh, 2003).

En plus des mécanismes génétiques, un certain nombre de mécanismes épigénétiques sont impliqués dans le développement du cancer colorectal. Ils seront traités dans la partie suivante.

II- La régulation épigénétique

1- Généralité : la régulation épigénétique

Le terme « épigénétique » se réfère à tous les changements stables et héritable du phénotype qui surviennent sans altération de la séquence nucléotidique de l'ADN sous-jacent (Baylin, 2005; Feinberg et al., 2006; Rountree et al., 2001).

Ce terme a été introduit pour la première fois en 1942 par Conrad Waddington, et décrivait les interactions causales entre les gènes et leurs produits, responsables de l'expression phénotypique (Waddington, 1942). On a longtemps pensé que l'hérédité de l'information épigénétique était limitée aux divisions cellulaires. Cependant, il est désormais évident que les processus épigénétiques peuvent être transmis d'une génération d'organisme à une autre. Ce phénomène, tout d'abord décrit chez les plantes, a ensuite été étendu à la levure, à la drosophile, puis à la souris et enfin à l'Homme (Tollefsbol, T., 2011). Bien que toutes les cellules d'un corps humain possèdent la même séquence d'ADN, elles acquièrent des caractéristiques particulières qui lui permettent de se différencier en organes distincts et de réaliser les fonctions métaboliques qui leur sont liées. Ceci indique que des mécanismes additionnels sont requis, indépendamment de la séquence d'ADN. De plus, différents épigénomes pourraient être impliqués dans les différents stades cellulaires, et même dans la survenue et l'évolution des maladies.

Les signaux épigénétiques utilisent trois mécanismes distincts : la méthylation de l'ADN, les modifications des histones, et l'ARN non-codant (Figure 8). Ces processus permettent la transmission stable des états d'activité des gènes au cours des divisions cellulaires. L'altération des événements épigénétiques pourrait ainsi conduire et/ou participer à la formation tumorale en dérégulant l'expression génique. C'est pourquoi il est désormais reconnu que les mécanismes épigénétiques jouent un rôle crucial dans la régulation des processus cellulaires fondamentaux, et leur dérégulation contribue aux maladies humaines, en particulier le cancer (Herceg & Vaissière, 2011). Des études récentes ont mis en évidence que des dérégulations épigénétiques jouent un rôle important dans de nombreux cancers, ce qui rend plus complexe encore le concept du développement tumoral. De plus, les mécanismes épigénétiques semblent jouer un rôle clé dans les interactions entre l'environnement et le génome (Herceg, 2007; Jaenisch & Bird, 2003; Shen et al., 2002). Une exposition prolongée à des agents environnementaux, physiques, chimiques ou infectieux, ainsi que des facteurs liés au style de vie, pourraient induire des changements épigénétiques aberrants qui conduiraient à un développement tumoral.

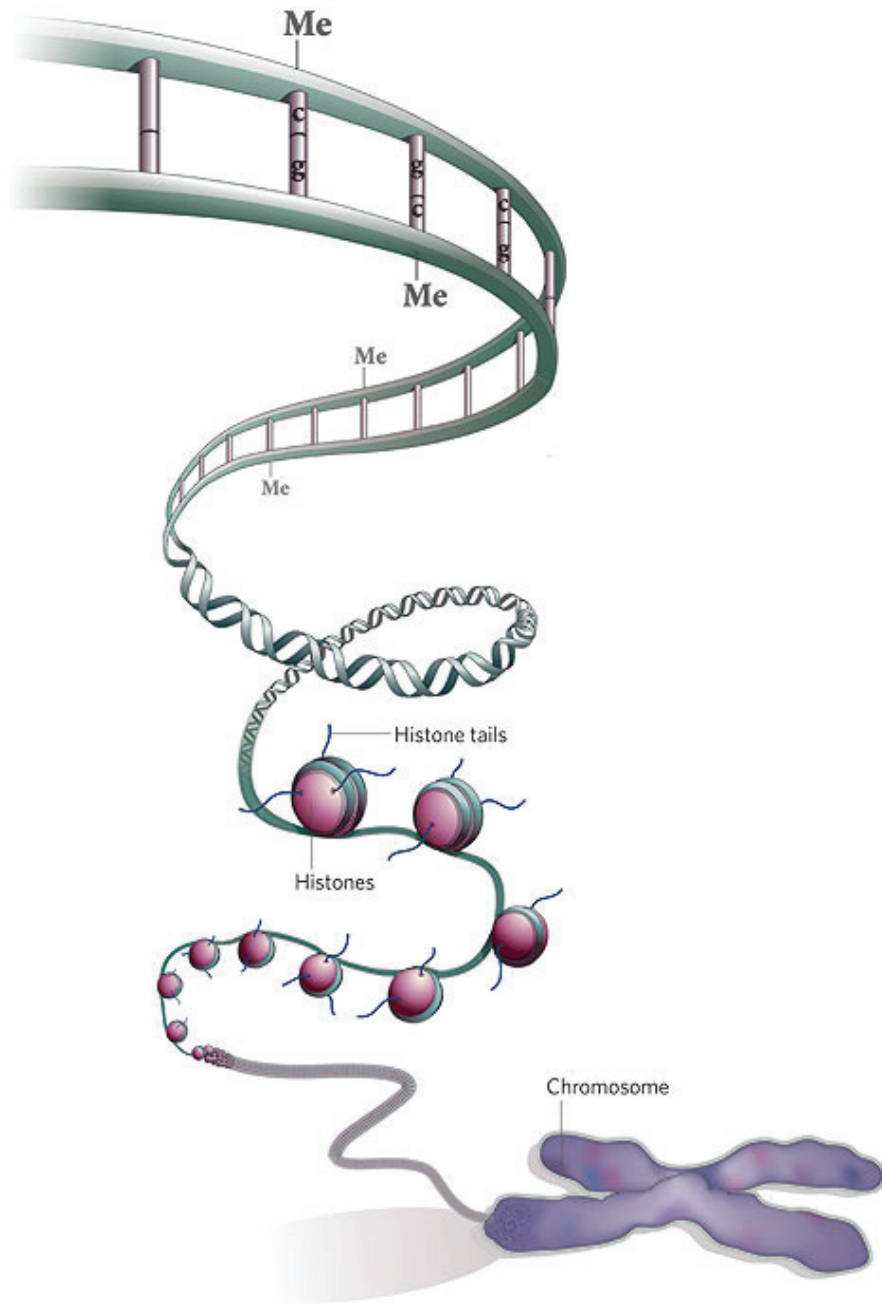


Figure 8 : Les deux voies principales de la régulation épigénétique.

La méthylation de l'ADN consiste en l'ajout d'un groupement méthyl (CH_3) sur les cytosines des îlots CpG. L'état de méthylation de l'ADN va impacter sur la condensation ou le relâchement de la chromatine, et ainsi sur l'expression génique elle-même.

La modification des histones consiste en une combinaison de différentes molécules qui peuvent s'attacher aux queues histones, les protéines formant le nucléosome autour duquel s'enroule l'ADN. Ces modifications des histones vont participer au contrôle de l'enroulement de l'ADN autour du nucléosome.

2- Les acteurs principaux de la régulation épigénétique

2.1- La structure chromatinienne : un rôle essentiel dans la régulation génique

2.1.1 - Une question de structure

A tous les niveaux, la régulation épigénétique dépend de la structure de la chromatine. La chromatine constitue la matrice fonctionnelle au sein de laquelle les gènes sont exprimés en fonction du contexte cellulaire. La configuration de la chromatine est hautement dynamique, avec à la fois une forme active et une autre inactive, coexistant dans le génome. La chromatine, peut se compacter pour protéger la molécule d'ADN, mais aussi rendre possible l'accès des facteurs et de la machinerie de transcription, aux régions promotrices des gènes (Cairns, 2009). En conséquence, le remodelage de la chromatine est le point de départ de la régulation génique. Deux conformations décrivent donc la structure de la chromatine : l'euchromatine et l'hétérochromatine. La prédominance de l'une ou l'autre de ces deux formes dépend des signaux épigénétiques.

2.1.2 – Hétérochromatine & Euchromatine

L'hétérochromatine est subdivisée en hétérochromatine constitutive, qui est condensée, et en hétérochromatine facultative, qui est une structure plus relâchée. L'hétérochromatine constitutive est localisée au niveau des centromères et des télomères des chromosomes, tandis que les gènes dont l'expression a été éteinte au cours du développement forment l'hétérochromatine facultative, dispersée le long des bras chromosomiques. Récemment, cette définition a été révisée suite à la mise en évidence de cinq formes de chromatine chez la *Drosophile* (Filion et al., 2010), et chez les organismes aux génomes étendus, on trouve aussi des régions d'hétérochromatine constitutive le long des bras chromosomiques. L'euchromatine quant à elle, est une structure non condensée du fait d'un espacement irrégulier des nucléosomes. C'est une chromatine relativement riche en gènes et active d'un point de vue transcriptionnel (Elgin and Grewal, 2003). Cependant ces différences entre hétéro- et eu- chromatine ne sont pas universelles. Une analyse du génome a montré que des régions péri-centromériques sont décondensées et que des régions euchromatiques sont compactées (Gilbert et al., 2004). Le remodelage de la chromatine est un processus dynamique de condensation ou de relâchement de la structure moléculaire, en fonction des signaux épigénétiques, et qui va conduire respectivement à l'extinction ou à l'activation d'un gène. C'est pourquoi les acteurs de la modification épigénétique jouent un rôle clé dans la régulation de l'expression génique.

2.2 - Les modifications des histones

2.2.1 - Les histones, pièces maîtresses de la structure chromatinienne

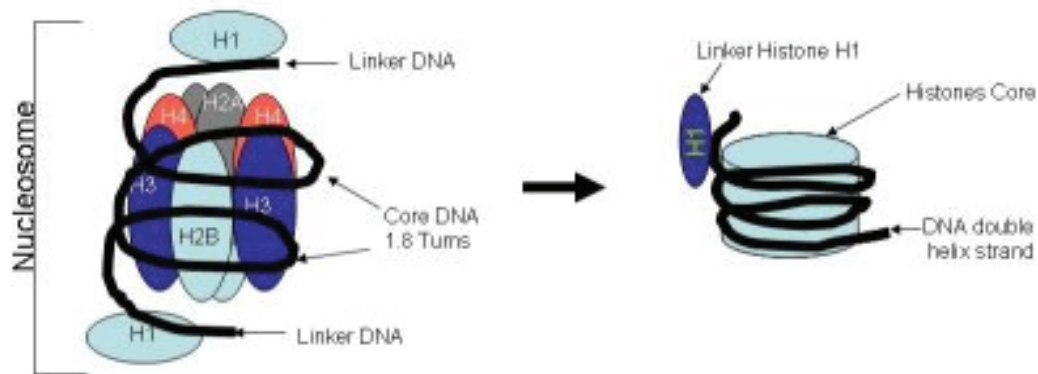
Les histones sont les protéines principales de la chromatine. Elles sont formées d'un corps globulaire extrêmement compact, composé d'hélices α assemblées en motifs hélice-boucle-hélice, qui favorisent l'oligomérisation. Ces histones sont organisés en unité fondamentale de chromatine, les nucléosomes, contenant 146 pb d'ADN enroulés par deux fois autour d'un octamère regroupant deux copies de chaque protéine histone : H2A, H2B, H3 et H4 (Bhaumik et al., 2007), ce sont les histones conventionnels, dit « de cœur ». La structure du nucléosome est relativement bien caractérisée (Caterino and Hayes, 2007; Richmond et al., 1997; Zhou et al., 2007) ; en plus des histones de cœur, des histones additionnels sont présents dans les cellules de mammifères. Ces variants d'histones diffèrent des autres par leur séquence primaire, et constituent un mécanisme de régulation supplémentaire en remplaçant les histones conventionnels, changeant ainsi les propriétés biophysiques du cœur du nucléosome (Hake and Allis, 2006; Henikoff and Ahmad, 2005; Wiedemann et al., 2010) (Figure 9).

2.2.2 - Un haut lieu des modifications épigénétiques

Les histones subissent des modifications chimiques dans leur région N-ter, appelée la « queue histone », qui constitue le site majeur de la régulation épigénétique pour les processus cellulaires fondamentaux (Herceg & Hainaut, 2007). Les modifications des histones incluent l'acétylation, la méthylation des lysines et arginines, la phosphorylation, l'ubiquitination, la sumoylation, la ribosylation de l'ADP, la déamination et l'isomérisation de la proline ; ces modifications constituent le « code histone ». Ce code pourrait étendre l'information codée par la séquence d'ADN, afin de réguler des processus tels que la transcription, la réparation de l'ADN et la réplication (Bhaumik et al., 2007; Kouzarides, 2007). L'acétylation des histones est largement associée avec une conformation ouverte de la chromatine et une transcription active. Les modifications des histones sont transmises aux cellules filles et peuvent donc être considérées comme un mécanisme épigénétique transmissible (Sawan et al., 2008; Vaissière et al., 2008).

Les modifications des histones sont établies par les histones acétyl-transférases (HATs), les histones méthyl-transférases (HMTs), et les protéines kinases, mais peuvent également être enlevées par les histones déacétylases (HDAC) et déméthylases. Ce sont les principaux mécanismes assurant l'équilibre de la structure chromatinienne. Les marques des histones créent ainsi une balance entre les signaux activateurs et répresseurs participant à la régulation des processus cellulaires.

A



B

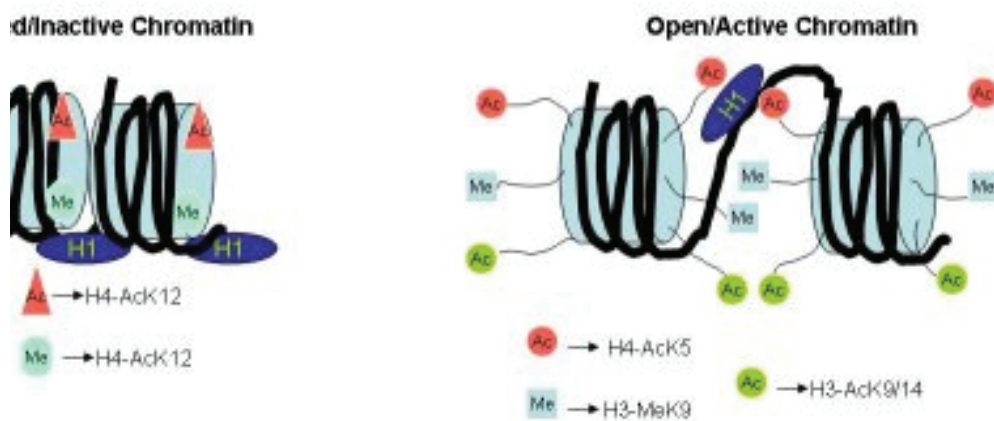


Figure 9 : La structure des nucléosomes, code histone, et changement de conformation de l'ADN.

A. Chaque nucléosome est composé de huit histones, soit deux histones H2A, H2B, H3 et H4. Ils sont associés à 146 pb d'ADN, et les nucléosomes sont reliés entre eux par un linker d'ADN et un histone H1.

B. Les modifications des histones se font sur la partie de la protéine appelée « Queue Histone ». Une importante méthylation des queues histones va entretenir une conformation fermée, inactive de l'ADN, tandis qu'une acétylation des histones entrainera une conformation ouverte, active de l'ADN, c'est-à-dire favorable à la transcription génique.

Des profils aberrants de modification des histones, de même qu'une dérégulation de l'activité des enzymes qui y sont associées, pourraient conduire à un développement cancéreux. Deux mécanismes ont été mis en évidence, qui pourraient conduire à une telle situation : l'altération du programme d'expression des gènes, incluant une régulation aberrante des oncogènes et/ou des suppresseurs de tumeur, et à un niveau plus global, une altération de l'intégrité du génome et/ou de la ségrégation des chromosomes (Bannister & Kouzarides, 2011).

2.3 - Les ARN non-codant

2.3.1 - Les ARNnc, de nouveaux acteurs de la régulation épigénétique

Un mécanisme épigénétique récemment découvert implique les ARNs, qui peuvent altérer les niveaux d'expression génique de manière héréditaire (Herceg & Paliwal, 2011). Les ARNs non-codant (non-coding RNA, ncRNAs) sont des ARNs qui sont transcrits à partir de l'ADN mais non traduits en protéines. Beaucoup sont fonctionnels et impliqués dans la production et la régulation d'autres ARNs tels que les ARNm, les ARNt et les ARNr (Tollefsbol, T., 2011). Il en existe deux types : les petits et les longs). Les petits ARNs non-codant les plus connus sont les microARNs (microRNAs, miRNAs) et les ARNs interférants (small interfering RNAs, siRNAs), impliqués dans la régulation d'ARNm cibles et de la chromatine. Le groupe des ARNs non-codant inclut aussi les petits ARN nucléaires (small nuclear RNAs, snRNAs) qui jouent un rôle dans l'épissage alternatif, et les petits ARNs nucléolaires (small nucleolar RNAs, snRNAs) qui modifient les nucléotides des ARNr, entre autres. Bien que la plupart des ARNnc soient regroupés sous le terme « ARN interférant » (RNA interference, RNAi), il existe clairement différentes manières par lesquelles les ARNnc interagissent avec les gènes pour augmenter ou diminuer leur expression, éteindre la transcription, ou guider la méthylation (Amaral et al., 2008; Collins & Chen, 2009; Collins & Penny, 2009). Les ARN non-codant dit long (>200 nt) sont eux aussi décrits comme étant impliqués dans la régulation génique (Mattick, 2009). Tous ces ARNnc forment un réseau de processus, « l'infrastructure ARN » (Collins & Penny, 2009), qui s'étend dans la cellule à la fois spatialement, les ARNnc étant en mouvement, mais aussi temporellement car les ARNnc régulent l'expression génique durant le cycle cellulaire (Collins & Penny, 2009).

2.3.2 - Implication des ARNnc dans les processus épigénétiques

L'implication des ARNnc dans des processus épigénétiques (Kurokawa et al., 2009), est décrite depuis quelques temps déjà pour l'inactivation du chromosome X (Chow & Heard, 2009) et le phénomène d'empreinte génétique (Royo & Cavaillé, 2008), mais d'autres rôles dans des

mécanismes non développementaux et en cancérogenèse commencent seulement à être mis en évidence. En effet, les microARNs ont particulièrement été étudiés ces dernières années, pour leur rôle potentiel dans le processus de cancérogenèse (Farazi et al., 2012; Kitade & Akao, 2010). Les microARNs sont de courts mono-brins d'ARN (20-23 nt) pouvant réguler négativement l'expression des gènes (Bartel et al., 2004). Contrairement aux modifications des histones et à la méthylation de l'ADN, l'extinction d'un gène par ARN interférence est un mécanisme post-transcriptionnel, qui peut renforcer d'autres événements plus en amont de régulation négative, en dégradant l'ARNm ou en inhibant la traduction. Cependant, le rôle des miARNs est loin d'être totalement élucidé, et récemment, de nouvelles études ont montré que l'environnement extérieur pourrait altérer leur expression, élargissant un peu plus le champ des investigations (Izzotti et al., 2009; Izzoti et al., 2010; Wang et al., 2009).

2.4 - La méthylation de l'ADN

Beaucoup d'événements cellulaires fondamentaux sont le résultat de signaux épigénétiques dont la méthylation de l'ADN (Bird, 2002). Les changements de la méthylation de l'ADN ont été largement étudiés, du fait de leur rôle dans des processus cellulaires majeurs comme le développement embryonnaire, la transcription, la structure de la chromatine, l'inactivation du chromosome X, l'empreinte génétique et la stabilité chromosomique (Baylin et al., 2001; Grønbæk et al., 2007), et de leur association fréquente avec des maladies humaines (Zardo et al., 2005).

2.4.1 - Les mécanismes basiques de la méthylation de l'ADN

La méthylation de l'ADN est une modification chimique résultant du transfert d'un groupe méthyl à partir d'un substrat donneur (la S-adenosyl-L-méthionine, SAM), uniquement en position 5' des bases cytosine des conformations CpG (« p » indiquant que la cytosine et la guanine sont liés par un pont phosphodiester) (Doerfler, 1983) (Figure 10).

La méthylation de l'ADN survenant hors des conformations CpG, tels que les séquences CpNpG, CpA ou CpT, ont également été décrites dans le génome eucaryote (Clark et al., 1995), en particulier dans les cellules souches embryonnaires de souris (Lister et al., 2009; Ramsahoye et al., 2000), mais son rôle reste non-élucidé.

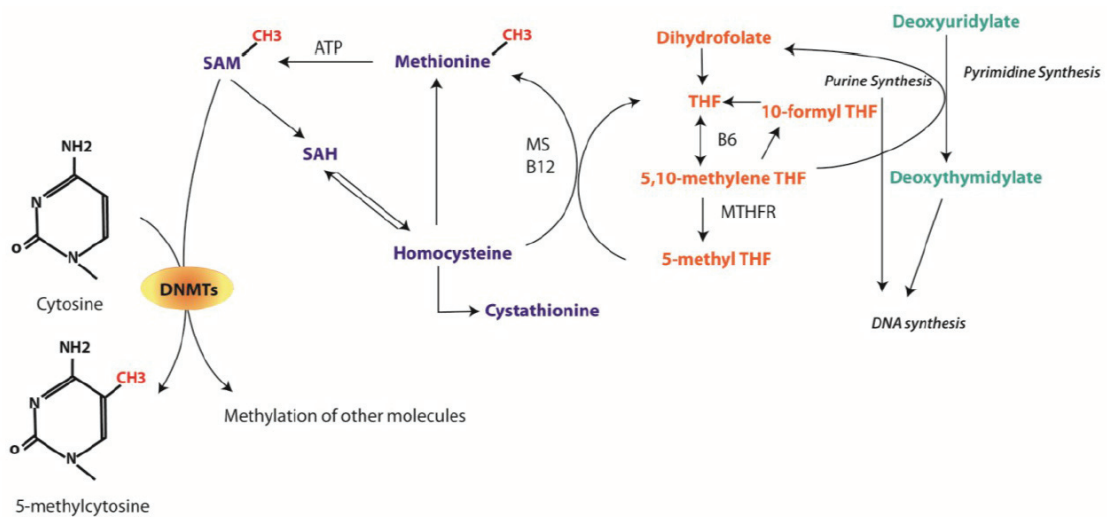


Figure 10 : Le processus de méthylation de l'ADN par les DNMTs

La méthylation de l'ADN est une modification chimique résultant du transfert d'un groupe méthyl à partir d'un substrat donneur (la S-adenosyl-L-méthionine, SAM), uniquement en position 5' des bases cytosine des conformations CpG (« p » indiquant que la cytosine et la guanine sont liés par un pont phosphodiester). La méthylation de l'ADN est assurée par les DNA-méthyl-tansferases (DNMTs).

2.4.1.a – Les DNMTs, au cœur du processus de méthylation

La réaction de méthylation des cytosines est conduite par une classe d'enzymes appelée les ADN méthyltransférases (DNA méthyltransferases, DNMTs), qui catalysent le transfert du groupe méthyl de la SAM vers la cytosine. Cinq membres de la famille des DNMTs ont été identifiés chez les mammifères : DNMT1, DNMT2, DNMT3A, DNMT3B et DNMT3L. Cependant, il semblerait que seules les DNMT1, 3A et 3B entrent en jeu dans la mise en place du motif global de méthylation des cytosines. Les DNMT3 A et B sont classifiées comme des enzymes de la méthylation *de novo* tandis que la DNMT1 est considérée comme responsable de la méthylation de maintenance. Il semblerait que les DNMT2 et 3L n'agissent pas en tant que cytosine méthyltransférase. L'équipe de Goll a récemment mis en évidence que la DNMT2 fonctionne comme une ARN méthyltransférase (Goll et al., 2006), tandis qu'il a été montré que la DNMT3L stimule la méthylation *de novo* de l'ADN par la DNMT3A et interagit avec l'histone déacétylase 1 pour réprimer la transcription (Chedin et al., 2002; Deplus et al., 2002) (Figure 11).

La DNMT1 semble être impliquée dans la restauration du profil de méthylation parental sur le brin fille nouvellement synthétisé, assurant ainsi le statut de méthylation des îlots CpGs à travers les générations (Figure 12). La perte de fonction de la DNMT1 chez la souris est embryonnairement létale, ce qui confirme l'importance de cette enzyme dans le fonctionnement cellulaire et le développement (Li et al., 1992). Une analyse structurale démontre que les domaines C-terminaux des DNMT3a et 3L forment un complexe tétramérique (3L-3a-3a-3L) avec deux sites actifs (Jia et al., 2007), qui méthyle préférentiellement deux CpGs distants de 8-10 pb *in vitro*. Cette périodicité de CpGs toutes les 8-10 pb est observée dans les locus d'empreinte maternelle (Jia et al., 2007), mais également dans de nombreuses autres régions du génome (Ferguson-smith & Greally, 2007; Glass et al., 2009). Cependant, ces CpGs répétés ne suffisent pas à expliquer pourquoi la méthylation *de novo* cible uniquement certaines séquences spécifiques (Glass et al., 2009). La méthylation *de novo* durant l'embryogenèse et le développement des cellules germinales est assurée par les DNMT3a et 3b. L'inactivation génique de l'une ou l'autre conduit à des phénotypes sévères (Okano et al., 1999)(Okano et al., 1999). Les souris KO pour la DNMT3a meurent peu de temps après la naissance tandis que le KO DNMT3b est létal embryonnairement. La DNMT3a semble être responsable de la méthylation de séquences critiques pour le développement tardif ou juste après la naissance, tandis que la DNMT3b pourrait être plus importante dans les stades précoces du développement (Okano et al., 1999). De plus, on pense que la DNMT3b méthyle spécialement l'ADN de régions particulières du génome, comme il a été montré dans des études du syndrome d'Immuno-déficience combinée (I), d'instabilité de l'hétérochromatine para-Centromérique (C) et de dysmorphie Faciale (ICF), une maladie causée par une mutation du gène DNMT3b (Jin et al., 2008), où l'on observe une hypométhylation de l'ADN au niveau des répétitions de l'ADN satellite (LINEs, SINEs, ...) et du chromosome X inactivé.

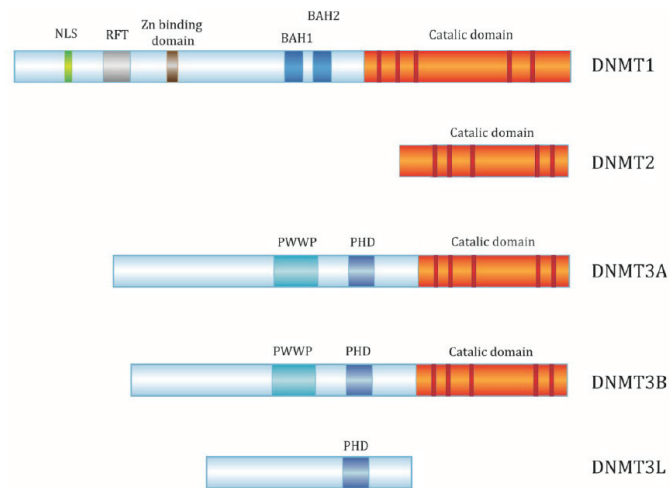


Figure 11 : Représentation schématique de la structure des DNMTs humaines et de la DNMT3-like protéine.

Les motifs conservés du domaine catalytique des DNMTs est indiqué en rouge. *NLS*, nuclear localization signal ; *RFT*, replication foci-targeting domain ; *BAH*, bromo-adjacent homology domain ; *PWWP*, un domaine contenant un motif conservé proline-tryptophan- tryptophan-proline ; *PHD*, une région riche en cystéines contenant un homéo-domaine atypique de plante ; *aa*, acides aminés.

La DNMT3L ne possède pas le motif catalytique des méthyltransférases, elle est donc inactive.

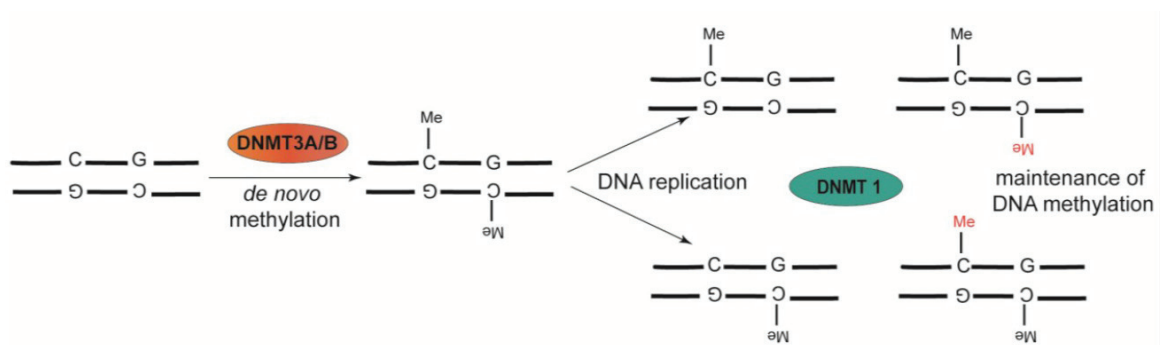


Figure 12 : Etablissement et transmission du profil de méthylation de l'ADN pendant la division cellulaire.

L'addition *de novo* d'un groupement méthyl sur une base cytosine de l'ADN est catalysée par les DNMT3A et DNMT3B, et est maintenue par la DNMT1 suite à la réplication de l'ADN.

2.4.1.b – Une distribution qui ne doit rien au hasard

Un pré-requis à la compréhension de la méthylation de l'ADN est la connaissance de sa distribution dans le génome. Il faut savoir que l'ensemble du génome se caractérise plutôt par une faible composition en CpG. En effet, les espèces subissant une méthylation importante de l'ADN de leur génome ont perdu des dinucléotides CpG au cours de l'évolution. C'est une conséquence directe de la méthylation de l'ADN, qui entraîne une augmentation des transitions C à T qui surviennent après la déamination des cytosines méthylées (Antequera & Bird, 1993). Les sites CpGs ne sont pas distribués de la même manière tout au long du génome, et se retrouvent à une fréquence plus élevée dans de petites régions de l'ADN appelées les îlots CpG (Bird, 1986). Si l'on considère la prévalence des CpGs, près de 60 % des promoteurs humains sont caractérisés par un taux de CpG élevé (Saxonov et al., 2006). Néanmoins, la densité en CpG elle-même n'influence pas l'expression génique. Près de 28 000 îlots CpGs sont dispersés dans le génome humain et environ 20 000 d'entre eux sont associés à un gène (Huang & Esteller, 2010), ce qui indique que la méthylation de ces régions spécifiques constitue un puissant mécanisme de régulation génique. Habituellement, ces îlots CpG ne sont pas méthylés quand un gène est transcriptionnellement actif, tandis qu'on observe une importante méthylation des régions promotrices des gènes dont l'expression est éteinte (ex : les gènes tissu-spécifiques ou de développement). La méthylation de l'ADN doit être hautement contrôlée pour maintenir l'équilibre entre la répression des éléments répétés et l'expression des gènes cellulaires fondamentaux.

Le génome des eucaryotes supérieurs contient un nombre important de séquences répétées (Séquences Alu, LINEs et SINEs). Une inhibition stable des rétro-transposons assure la stabilité et l'intégrité du génome (Elgin & Grewal, 2003). L'inhibition permanente de ces séquences est principalement due à une méthylation de l'ADN. Cependant, le contrôle épigénétique peut être permissif, comme c'est le cas de l'expression des gènes du développement (Reik, 2007). En effet, bien que les profils de méthylation soient largement conservés au fil des divisions cellulaires somatiques, des modifications peuvent survenir au cours du développement et de la différenciation cellulaire. Chez la souris, une reprogrammation épigénétique importante survient dans les cellules germinales et chez les embryons précoces, par vagues de dé-méthylation suivies par une reméthylation (Morgan et al., 2005). Mais après l'implantation, une large méthylation *de novo* rétablit les profils de méthylation de l'ADN, qui seront maintenus dans une large part des tissus somatiques. En plus de ces changements globaux, les gènes sont méthylés ou déméthylés de manière spécifique pendant la différenciation cellulaire.

La façon dont la méthylation de l'ADN contribue à l'inhibition de l'expression génique reste mal comprise et plusieurs hypothèses sont proposées. Tout d'abord, on a pensé que pour certains facteurs de transcription (AP-2, c-myc, CREB/ATF et NF-kB), la méthylation de l'ADN créait une barrière physique en empêchant l'accès aux sites de fixation des promoteurs (Zingg & Jones, 1997), une hypothèse pouvant être valable pour certains facteurs de transcription, mais pas pour tous. Un modèle de l'inactivation génique due à la méthylation de l'ADN est lié aux

domaines de liaison protéiques aux CpG méthylés (methyl-CpG binding domain proteins, MBDs). En général, la méthylation de l'ADN est considérée comme une étape d'initiation de l'établissement d'une conformation fermée de la chromatine. Elle est suivie par l'association des MBDs à la chromatine, qui vont recruter des histones déacétylases, décrites pour être des enzymes induisant des modifications épigénétiques répressives. La chromatine va alors se compacter ce qui va éteindre l'expression génique. Cependant, dans certains processus, d'autres mécanismes entrent en jeu avant la survenue de la méthylation de l'ADN. Par exemple, chez *Neurospora crassa*, un champignon filamenteux, la méthylation de l'ADN dépend de la méthylation de l'histone 3 sur la lysine 9 (H3K9), et seule cette modification peut déclencher une répression épigénétique (Tamaru & Selker, 2001).

2.4.2 – Le processus de dé-méthylation

Pour comprendre comment ces profils de méthylation sont établis et maintenus, il est nécessaire d'élucider les mécanismes de méthylation de l'ADN, mais aussi de dé-méthylation. La dé-méthylation de l'ADN peut avoir lieu passivement, en ne méthylant pas le brin d'ADN nouvellement synthétisé après la réplication, ou activement par un processus indépendant de la réplication. De nombreux éléments mettent en évidence l'existence d'une dé-méthylation active du génome des zygotes et des cellules germinales primaires (Hajkova et al., 2002; Mayer et al., 2000; Morgan et al., 2005; Oswald et al., 2000), ainsi qu'une dé-méthylation active spécifique de certains loci dans des cellules somatiques, comme par exemple les neurones (Ma et al., 2009) et les lymphocytes T (Bruniquel & Schwartz, 2003)(Bruniquel & Schwartz, 2003). Cependant ces mécanismes de dé-méthylation active restent mal connus.

Plusieurs mécanismes ont été proposés pour l'enlèvement enzymatique du groupe 5-méthyle des 5mC, des bases 5mC et des nucléotides 5mC. La récente découverte d'une base modifiée 5-hydrocymethylcytosine (5hmC), désormais considérée comme la 6^{ème} base de l'ADN des mammifères (Münzel et al., 2011), pourrait avoir d'importantes implications dans les mécanismes de la dé-méthylation active et ouvrir de nouvelles pistes de recherche. Il a récemment été montré chez la souris et chez l'homme que les protéines de la famille TET (Ten-Eleven-Translocation) sont capables de catalyser la conversion de la 5mC en 5hmC (Ito et al., 2011). Selon le consensus actuel, la dé-méthylation surviendrait alors par une réparation de cette 5hmC par un processus de BER (Base Excision Repair). Deux nouvelles études ont identifié de nouveaux intermédiaires de ce processus de dé-méthylation. En effet il été démontré que les protéines de la famille TET ont la capacité de convertir les 5mC en 5hmC, mais également en 5-formylcytosine (5fC) et en 5-carboxylcytosine (5caC), *in vitro* (He et al., 2011; Ito et al., 2011). De plus, la 5hmC peut aussi être oxydée en 5caC (He 2011), une base qui est spécifiquement reconnue et excisée par une TDG (thymine DNA glycosylase), ce qui produirait une configuration pouvant initier une BER (He et al., 2011) ([Figure 13](#)).

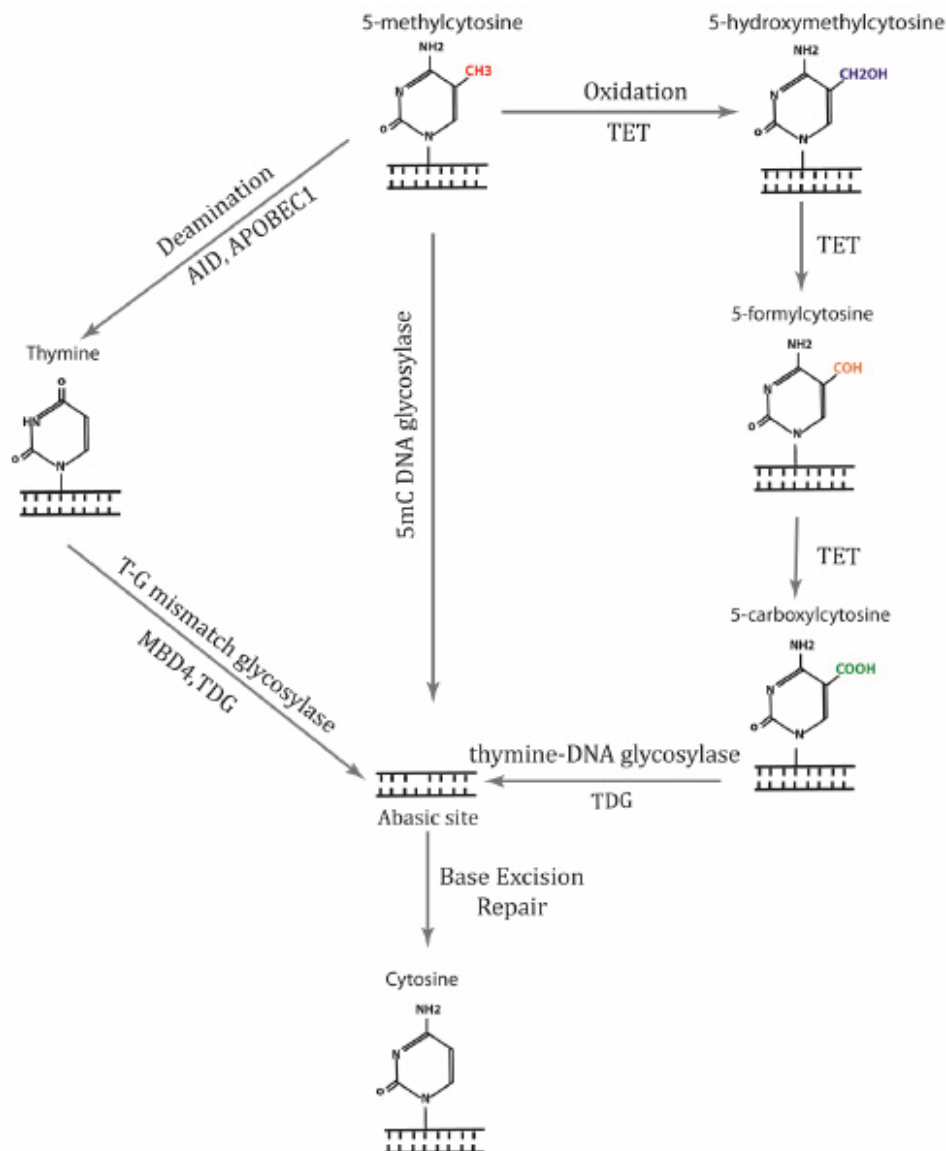


Figure 13 : Modèle représentant les différents mécanismes possibles de la dé-méthylation active de l'ADN.

Récemment découvert, la 5-hydroxyméthylcytosine (5hmC) est désormais considérée comme étant la 6^{ème} base de l'ADN des mammifères.

Les protéines de la famille TET ont la capacité de convertir les 5mC en 5hmC, mais également en 5-formylcytosine (5fC) et en 5-carboxylcytosine (5caC). De plus, la 5hmC peut aussi être oxydée en 5caC (He 2011), une base qui est spécifiquement reconnue et excisée par une TDG (thymine DNA glycosylase), ce qui produirait une configuration pouvant initier une BER (Base Excision Repair).

Ainsi selon le consensus actuel, la dé-méthylation surviendrait par une réparation de cette 5hmC par un processus de BER.

Le débat sur l'existence d'une dé-méthylation active de l'ADN reste vif. Il a été relancé par la découverte de la 5hmC et de son excision lors de la réparation de l'ADN, ce qui donne lieu à la génération d'un nouveau brin non méthylé. Cependant, là où certains voient une transformation active et dirigée de la 5mC en 5hmC dans le but de conduire à une dé-méthylation par réparation de l'ADN, d'autres n'y voient qu'un phénomène dont la survenue est due au hasard (Bhutani et al., 2011). La dé-méthylation de l'ADN est donc loin d'avoir livré tous ses mécanismes, et de nombreuses investigations restent à mener.

3 - Les modifications épigénétiques dans les cancers colorectaux

Les mécanismes épigénétiques altèrent l'expression des gènes sans affecter leur séquence initiale. Ces changements impliquent des modifications biochimiques de la chromatine, à savoir une hypo- ou une hyper-méthylation de l'ADN, ainsi que des modifications biochimiques des histones. Ces modifications ont pour conséquence un changement de conformation de la chromatine (relâchée ou condensée), qui va modifier l'accessibilité de l'ADN, et donc l'expression des gènes. En effet, en conformation « fermée » (condensée), la chromatine est inaccessible aux facteurs de transcription, ce qui induit une répression transcriptionnelle, tandis qu'une conformation « ouverte » (relâchée) favorise la transcription.

3.1- Hyperméthylation des gènes suppresseurs de tumeur

L'hyperméthylation des gènes suppresseurs de tumeurs est fréquemment observée en cancérogenèse. Elle conduit à une répression de leur expression, en empêchant la fixation des facteurs de transcription au niveau des régions promotrices. Ce phénomène peut affecter un seul des deux allèles des gènes concernés, et peut être accompagné d'une délétion par LOH ou d'une mutation inactivatrice du second allèle, dans le cadre de la théorie des deux événements de Knudson (Knudson, 1985). Cependant une hyperméthylation bi-allélique des certains gènes suppresseur de tumeurs a été décrite (Lusher et al., 2002; Veigl et al., 1998; Yang et al., 2001).

L'hyperméthylation dans les cancers touche des gènes impliqués dans diverses fonctions cellulaires clés telles que la régulation du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN, l'apoptose, la différenciation ou l'angiogenèse (pour revues : Esteller, 2005; Esteller & Almouzni, 2005). Parmi les gènes subissant une hypermethylation de leur promoteur dans les cancers colorectaux on retrouve par exemple APC, impliqué dans la régulation de la voie Wnt (inhibition), ou MLH1, responsable de la réparation des mésappariements de l'ADN.

Les DNA Methyl Transférases (DNMTs) sont des effecteurs du processus de méthylation de l'ADN. Une dérégulation et une augmentation de l'expression des DNMTs ont été mise en évidence dans les cellules tumorales colorectales, ce qui conforte l'idée d'une altération de la machinerie de la méthylation (Marzo et al., 1999). La méthylation aberrante des gènes suppresseurs de tumeurs peut être à la fois un processus impliqué dans l'initiation et dans la progression tumorale (Lao and Grady, 2012). Ainsi la méthylation du promoteur de Mlh1, mentionnée plus haut, serait plutôt un phénomène initiateur (Kane et al., 1997). Des méthylations importantes ont également été détectées dans des adénomes précoces et des adéno-carcinomes folliculaires (Aguilera et al., 2006; Mittag et al., 2006)(Aguilera et al., 2006 ; Mittag et al., 2006), entre autre dans les régions promotrices des gènes codant pour les protéines SFRP, inhibitrices de la voie Wnt. L'activation constitutive de cette voie qui en résulte prédisposerait à l'apparition d'autres altérations génétiques complémentaires telles que la mutation des gènes Apc ou β -caténine (Suzuki et al., 2004). Ce phénomène d'hyperméthylation des promoteurs de gènes suppresseurs de tumeurs est ensuite retrouvé tout au long de la progression tumorale.

3.2- Hypométhylation globale du génome tumoral

L'hypométhylation globale du génome est la première altération épigénétique identifiée dans les cellules cancéreuses (Feinberg and Vogelstein, 1983). En effet, alors que l'hyperméthylation semble cibler les gènes suppresseurs de tumeurs, le génome tumoral est marqué par une hypométhylation globale, de 20 à 60% de réduction par rapport au génome normal (Kisseljova and Kisseljov, 2005). Cette hypométhylation pourrait induire la réactivation d'éléments transposables (tels les LINEs, Long Interspersed Nucleotide Elements), qui une fois redevenus mobiles, pourraient inactiver des gènes clés (Pavicic et al., 2012; Sunami et al., 2011), jouant ainsi un rôle dans l'instabilité génomique (Karpf and Matsui, 2005; Rodriguez et al., 2006). L'hypométhylation induirait également l'activation de gènes soumis à l'empreinte parentale et de proto-oncogènes (Feinberg & Vogelstein, 1983), mais aussi de gènes éteints lors de la différenciation. L'ensemble de ces mécanismes peut conférer un avantage sélectif de croissance aux cellules tumorales (Cui et al., 2003).

Cette hypométhylation globale apparaît dès les stades précoces de la séquence adénome-carcinome, et pourrait donc participer à l'initiation des cancers colorectaux (Lao and Grady, 2012). Un exemple de conséquence de ce phénomène est la perte de l'empreinte (Loss Of Imprinting, LOI) du locus Igf-II (Insulin Growth Factor) : cet événement entraîne une surexpression de ce gène retrouvée dans la muqueuse colique normale de patients atteints de cancers, impliquant une réelle prédisposition à la maladie (Cui et al., 2003; Sakatani et al., 2005). Des souris exprimant de manière biallélique Igf-II, par délétion hétérozygote d'un élément méthylé répresseur de la transcription, présentent une expression deux fois plus forte que la normale, et équivalente à celle observée chez l'homme dans les cas de LOI. Ces souris développent un phénotype de dédifférenciation de l'épithélium intestinal normal, accompagné

d'une augmentation de la profondeur des cryptes. De plus, ces souris, croisées avec des souris $Apc^{+/min}$, présentent deux fois plus de lésions tumorales que les souris parentales $Apc^{+/min}$, ce qui confirme l'effet de la perte de l'empreinte sur la carcinogenèse colorectale (Sakatani et al., 2005).

Récemment, dans le cadre d'études de la méthylation dans le cancer colorectal, des régions méthylées de manière différentielle ont été identifiées : les « cancer-specific differentially DNA-Methylated Regions » ou cDMRs (Hansen et al., 2011). Les variations de méthylation au niveau des cDMRs permettraient de distinguer le tissu normal du tissu tumoral dans de nombreux types de tumeurs : cancer du colon, du poumon, du sein et de la thyroïde. Des adénomes, que l'on peut considérer comme un stade de transition entre normal et tumoral, ont montré des variations épigénétiques intermédiaires. Ces cDMRs pourraient donc constituer un nouveau marqueur de tumorigenèse (Hansen et al., 2011).

III- TRKC, un récepteur multi-facettes

1- TRKC, un récepteur à neurotrophine

1.1 – La théorie neurotrophique

Les fonctions complexes du système nerveux, central et périphérique, exigent une adaptation et une importante organisation de sa structure. La vie des neurones, leur différenciation, le guidage axonal, leur fonction, et même leur mort, sont minutieusement contrôlés et modelés par des facteurs trophiques et des molécules de guidage, parmi lesquelles les neurotrophines jouent un rôle clé.

C'est avec la découverte du NGF et de son rôle essentiel pour la survie neuronale et la croissance axonale, il y a près de 50 ans, par Viktor Hamburger, Stanley Cohen et Rita Levi-Montalcini, qu'a débuté l'étude des neurotrophines (Levi-Mintacini & Angeletti, 1963). Ils montrèrent que la survie neuronale était affectée par la modification de la taille du tissu cible. Ce fut la première démonstration du contrôle du nombre de neurones par la disponibilité des cibles innervées. Ce travail, récompensé par un prix Nobel en 1986, constitue le fondement de la théorie neurotrophique : un neurone est engagé vers une mort « par défaut » à moins qu'il atteigne sa cible et reçoive un signal de survie induit par le facteur neurotrophique exprimé par la cible. La quantité limitée de facteur trophique produit par la cible régule finement la quantité de neurones et leur guidage.

1.2 – Les neurotrophines et leurs récepteurs

Les neurotrophines constituent une famille hautement conservée de protéines sécrétées, qui orchestrent la survie des neurones, leur différenciation et la pousse des axones vers les territoires cibles (Arévalo & Wu, 2006; Huang & Reichardt, 2003). La famille des neurotrophines comprend NGF (Nerve Growth Factor), BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor), NT-3 (NeuroTrophin-3) et NT-4/5 (NeuroTrophin-4/5). Elles sont sécrétées à de grandes distances par les territoires cibles, c'est-à-dire par les neurones du système nerveux et les cellules non-neuronales de la périphérie. Un gradient de ligand permet d'agir sur des populations spécifiques de neurones, en modulant leur migration et leur survie. Les neurones connectés à leur cible, et donc liés aux neurotrophines correspondantes survivront à la période de mort neuronale massive, tandis que la plupart des autres mourront.

Les neurotrophines sont initialement synthétisées sous forme de précurseurs, les pro-neurotrophines, qui sont clivées par les furines ou les pro-convertases, pour générer des neurotrophines matures d'environ 12 kDa (Mowla et al., 2001). Les neurotrophines partagent une

structure homologue à celles d'autres facteurs de croissance bien caractérisés tels que le TGF- β (Transforming Growth Factor- β) ou le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF). D'autres neurotrophines, comme les NT-6 et NT-7, ont récemment été isolées chez le poisson. Cependant il semblerait qu'elles n'aient pas d'orthologues chez les mammifères (Reichardt, 2006).

Les neurotrophines se lient et activent deux types de récepteurs cellulaires : les récepteurs à tyrosines kinase (TRK A, B et C), et le récepteur p75NTR, un membre de la superfamille des récepteurs au facteur de nécrose tumorale (Tumor Necrosis Factor, TNF) (Huang & Reichardt, 2003). Les structures des récepteurs TRK ont en commun plusieurs domaines immunoglobuline-C2, et des répétitions riches en résidus leucine et cystéine dans leur partie extracellulaire, tandis que leur queue intracellulaire contient le domaine tyrosine kinase. Le récepteur p75NTR possède 4 répétitions extracellulaires riches en cystéines mais aucun domaine kinase. Contrairement aux TRKs, il possède, un domaine de mort (Yano & Chao, 2000).

1.3 – Rôle de TRKC dans le développement du système nerveux

Au sein de notre équipe, nous nous sommes concentrés sur l'étude du récepteur à neurotrophine TRKC. TrkC est localisé sur le chromosome 15q24-q25 (McGregor et al., 1994), et la glycoprotéine de 145 kDa issue de l'expression de ce gène présente une forte homologie avec TRKA et TRKB. Plus précisément, tandis que leurs domaines extracellulaires partagent 50% d'homologie, au niveau de leurs domaines tyrosine kinase, très conservés, on retrouve jusqu'à 85% d'homologie (Lamballe et al., 1991). Comme les autres récepteurs à neurotrophines, TRKC est caractérisé par des domaines riches en cystéines et en leucines dans sa partie extracellulaire, et un domaine kinase en C-terminal.

1.3.1 – Profil d'expression de *Nt-3* et *TrkC*

Chez la souris, *TrkC* est exprimé très tôt au cours du développement, au stade E8 (Tessarollo et al., 1993). Plus tard, à E9.5, l'expression est associée aux cellules des crêtes neurales, et progressivement TRKC pourra être détecté dans certaines structures du système nerveux central (SNC), mais surtout dans le système nerveux périphérique (SNP). Dans le SNP, TRKC est principalement présent dans les racines ganglionnaires dorsales (Dorsal Root Ganglia, DRGs). On observe que TrkC est souvent exprimé conjointement avec *TrkA* et *TrkB*, cependant il existe des régions où seul TRKC est détecté, comme dans le système nerveux entérique (Chalazonitis, 2004).

Chez l'adulte, *TrkC* est largement exprimé dans le SNC : dans le cortex cérébral, le putamen caudal, le thalamus, l'hippocampe, et le cervelet (Tessarollo et al., 1993). *TrkC* est également exprimé dans des tissus non neuronaux tels que le cœur, les poumons, les glandes submandibulaires, le tissu adipeux brun ou les glandes surrénales (Donovan et al., 1995; Tessarollo et al., 1993).

Le ligand de TRKC, NT-3, est exprimé juste en avant du front de migration des cellules des crêtes neurales. Ces cellules vont coloniser les DRGs et les territoires cibles des neurones sensoriels qui innervent ensuite la peau et les muscles des membres (Fariñas et al., 1996). TRKC/NT-3 jouent un rôle clé dans l'organisation spatio-temporelle des neurones sensoriels. Nt-3 est également exprimé dans le cervelet et dans des structures non neuronales

1.3.2 – Rôle de TRKC dans la formation des DRGs

L'invalidation génique de *TrkC* et *Nt-3* chez la souris a renforcé l'idée qu'ils jouent un rôle important pour la formation du système nerveux sensoriel, spécifiquement dans les DRGs. Cependant il a été rapporté que d'autres populations de neurones, comme les neurones entériques, sont réduites chez les souris KO pour Nt-3 (Chalazonitis et al., 2001). Les DRGs sont colonisés par des neurones issus des cellules des crêtes neurales. Ces cellules, situées dans la partie dorsale du tube neural, vont se déplacer par délamination dans le mésenchyme ventro-latéral, entre E8 et E10 chez la souris.

La majorité des précurseurs neuronaux parviennent dans les DRGs entre E10 et E13, une fenêtre temporelle critique dans laquelle coexistent prolifération, différenciation, neurogenèse et apoptose développementale des neurones en excès. A E10, on observe l'expression de *TrkC* dans les précurseurs des DRGs, mais à E13 survient ce qu'on appelle le « Switch neurotrophique » : *TrkC* n'est alors plus exprimé que dans 30% des neurones, les neurones proprioceptifs. Les 70% restant expriment *TrkA* ou *TrkB*, et répondent respectivement au NGF ou au BDNF (Farinas et al., 1998; Tessarollo et al., 1993).

Ainsi les DRGs sont des structures hétérogènes, constitués de neurones de formes et de fonctions différentes. Les neurones qui expriment *TrkA*, de petit diamètre, véhiculent la sensation de douleur, ce sont les neurones nociceptifs. Ceux exprimant *TrkB*, de diamètre moyen, sont les neurones de la mécanoeception, tandis que les neurones de large diamètre, responsables de la proprioception des membres, expriment *TrkC* (Marmigère & Ernfors, 2007).

L'invalidation des différentes neurotrophines et de leurs récepteurs dans des modèles de souris a démontré l'importance de cette signalisation pour la survie et la différenciation neuronale dans les DRGs. Les souris invalidées pour *TrkA* ou *Ngf* présentent une perte identique des neurones nociceptifs (Crowley et al., 1994). La même constatation est faite pour les neurones mécanoeceptifs, dans le cas d'un double-KO *TrkB/Bdnf* (Ernfors et al., 1995). Cependant, tandis

qu'une invalidation de *Nt-3* génère une perte de 70% des neurones des DRGs, le KO de *TrkC* entraîne une perte de seulement 30% des neurones (Tessarollo et al., 1997).

1.4 – Transduction du signal neurotrophique par les récepteurs TRKs

La grande majorité des revues scientifiques dédiées aux neurotrophines traitent de la signalisation positive, pro-survie qu'elles engendrent en se liant à leurs récepteurs. En activant les récepteurs à tyrosine kinase TRKs, les neurotrophines interviennent dans la régulation de différents processus, comme la prolifération et la survie des neurones, la croissance axonale et dendritique, le remodelage du cytosquelette, la formation et le fonctionnement des synapses. De plus les neurotrophines sont aussi impliquées en dehors du système nerveux, par exemple dans le développement cardiaque, la néo-vascularisation ou l'homéostasie du système immunitaire (Reichardt, 2006).

L'activation des récepteurs TRKs par la fixation de leurs ligands entraîne leur dimérisation, suivie par une auto-phosphorylation des résidus tyrosines de leur domaine catalytique. Une fois phosphorylés, les récepteurs TRKs vont recruter et activer un certain nombre de protéines effectrices qui sont les médiateurs intracellulaires de la cascade de signalisation des neurotrophines. Ces médiateurs peuvent être des protéines de modulation ou d'ancrage. Les protéines modulatrices possèdent des domaines SH2 (Src Homology 2) ou PTB (PhosphoTyrosine Binding), qui sont directement reconnus par les tyrosines phosphorylées des récepteurs. Les protéines d'ancrage présentent dans leur région N-terminale une séquence signal variable, et dans leur région C-terminale, des sites de liaisons pour les domaines SH2 des protéines de signalisation (Schlessinger, 2000). Les récepteurs TRKs constituent donc une importante plateforme pour le recrutement indirect de protéines de signalisation, en réponse à leur stimulation par la fixation du ligand (Figure 14).

C'est dans la lignée cellulaire de rat, pheochromocytoma PC12, que la signalisation neurotrophique a été largement caractérisée (Hagag et al., 1986). La majorité des voies de signalisation déclenchées par les neurotrophines sont RAS-MAP-kinase (MAPK), PI3-kinase (PI3K), PhosphoLipaseC- γ 1 (PLC- γ 1) et leurs effecteurs en aval.

Il a tout d'abord été montré que cette signalisation positive passait par la GTPase RAS (Borasio 1993). L'activation transitoire de RAS est initiée par la tyrosine phosphorylée Y490 des récepteurs TRKs (phosphor-Y490). Les récepteurs TRKs vont également recruter différents adaptateurs protéiques tels que SHC, SH2-B, FRS2 et IRS1. A son tour, RAS activé va stimuler la signalisation par PI3-kinase, p38MAPK et c-RAF-ERK (Reichardt, 2006). Les protéines kinases MAPK et ERK vont alors activer le facteur de transcription CREB (C-AMP Response Element-binding protein), qui contrôle l'expression de gènes essentiels à la survie et à la différenciation neuronale (Arévalo & Wu, 2006).

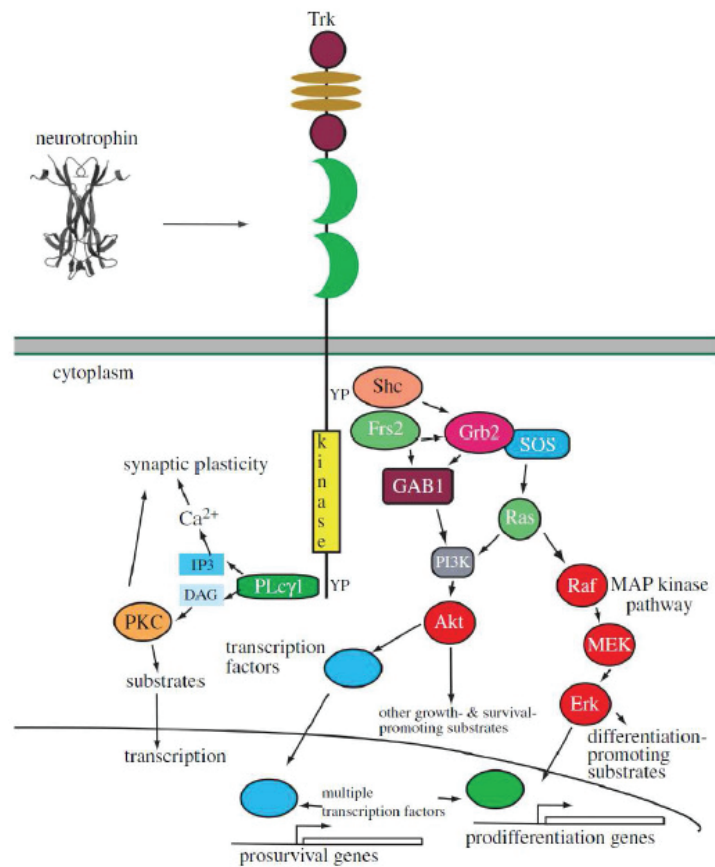


Figure 14 : La signalisation neurotrophique.

L'activation des récepteurs TRKs par la fixation de leurs ligands entraîne leur dimérisation, suivie par une auto-phosphorylation des résidus tyrosines de leur domaine catalytique. Une fois phosphorylés, les récepteurs TRKs vont recruter et activer un certain nombre de protéines effectrices qui sont les médiateurs intracellulaires de la cascade de signalisation des neurotrophines. Ces médiateurs peuvent être des protéines de modulation ou d'ancrage. Les protéines modulatrices possèdent des domaines SH2 (Src Homology 2) ou PTB (PhosphoTyrosine Binding), qui sont directement reconnus par les tyrosines phosphorylées des récepteurs. Les protéines d'ancrage présentent dans leur région N-terminale une séquence signal variable, et dans leur région C-terminale, des sites de liaisons pour les domaines SH2 des protéines de signalisation. Les récepteurs TRKs constituent donc une importante plateforme pour le recrutement indirect de protéines de signalisation, en réponse à leur stimulation par la fixation du ligand.

(Adaptée de Reichardt, 2006)

La voie PI3-AKT est elle aussi requise pour l'action pro-survie des neurotrophines. En phosphorylant BAD, AKT bloque son action pro-apoptotique (Datta et al., 1997), et de manière similaire, inhibe FKHRL1, un facteur de transcription essentiel pour beaucoup de protéines pro-apoptotiques (Zheng et al., 2002). De plus, AKT inactive IκB, un inhibiteur du facteur de transcription pro-apoptotique NF-κB (Arévalo and Wu, 2006).

Enfin, la voie PLC- γ 1 va réguler les taux de Ca^{2+} intracellulaire et l'activité de la protéine kinase C (PKC), par la génération d'inositol tri-phosphate (IP3) et de diacylglycerol (DAG). La signalisation PLC- γ 1 semble importante pour la plasticité synaptique (Bibel and Barde, 2000).

2- TRKC, un récepteur à dépendance

2.1 – Le concept des récepteurs à dépendance

2.1.1 – Le concept

Les récepteurs à dépendance ont la particularité d'avoir une double signalisation. En présence de leur ligand, ces récepteurs induisent une signalisation positive de prolifération, de différenciation, de migration et/ou de survie, caractérisant la plupart des récepteurs transmembranaires. En absence de leur ligand, ces récepteurs induisent une signalisation négative entraînant la mort de la cellule par apoptose. Les cellules qui expriment ces récepteurs sont donc dépendantes de la présence de ligand dans leur environnement pour survivre, d'où le terme "récepteur à dépendance" (Figure 15).

2.1.2 – Une grande famille

La famille fonctionnelle des récepteurs à dépendance comporte actuellement 18 membres. Ils sont pour la plupart transmembranaires, ne présentent pas d'homologie de structure ou de séquence. Le premier qui fut caractérisé est le récepteur aux neurotrophines p75^{NTR} et son ligand NGF (Rabizadeh et al. 1993). Plusieurs récepteurs à dépendance sont des récepteurs à la nétrine-1 tels que DCC (Deleted in Colorectal Cancer) (Mehlen et al. 1998), ou UNC5H1, 2, 3 et 4 (Llambi et al., 2001; Wang et al., 2008). Le récepteur aux androgènes (AR) (Ellerby et al. 1999), les intégrines $\alpha 5\beta 3$ et $\alpha 5\beta 1$ qui se lient aux constituants de la matrice extracellulaire (Stupack et al., 2001), le récepteur PATCHED (Ptc) dont le ligand est le morphogène Shh (Thibert et al., 2003), le récepteur néogénine et son ligand RGM α (Repulsive Guidance Molecule) (Matsunaga et al., 2004), sont autant de récepteurs qui ont été caractérisés comme étant des récepteurs à dépendance.

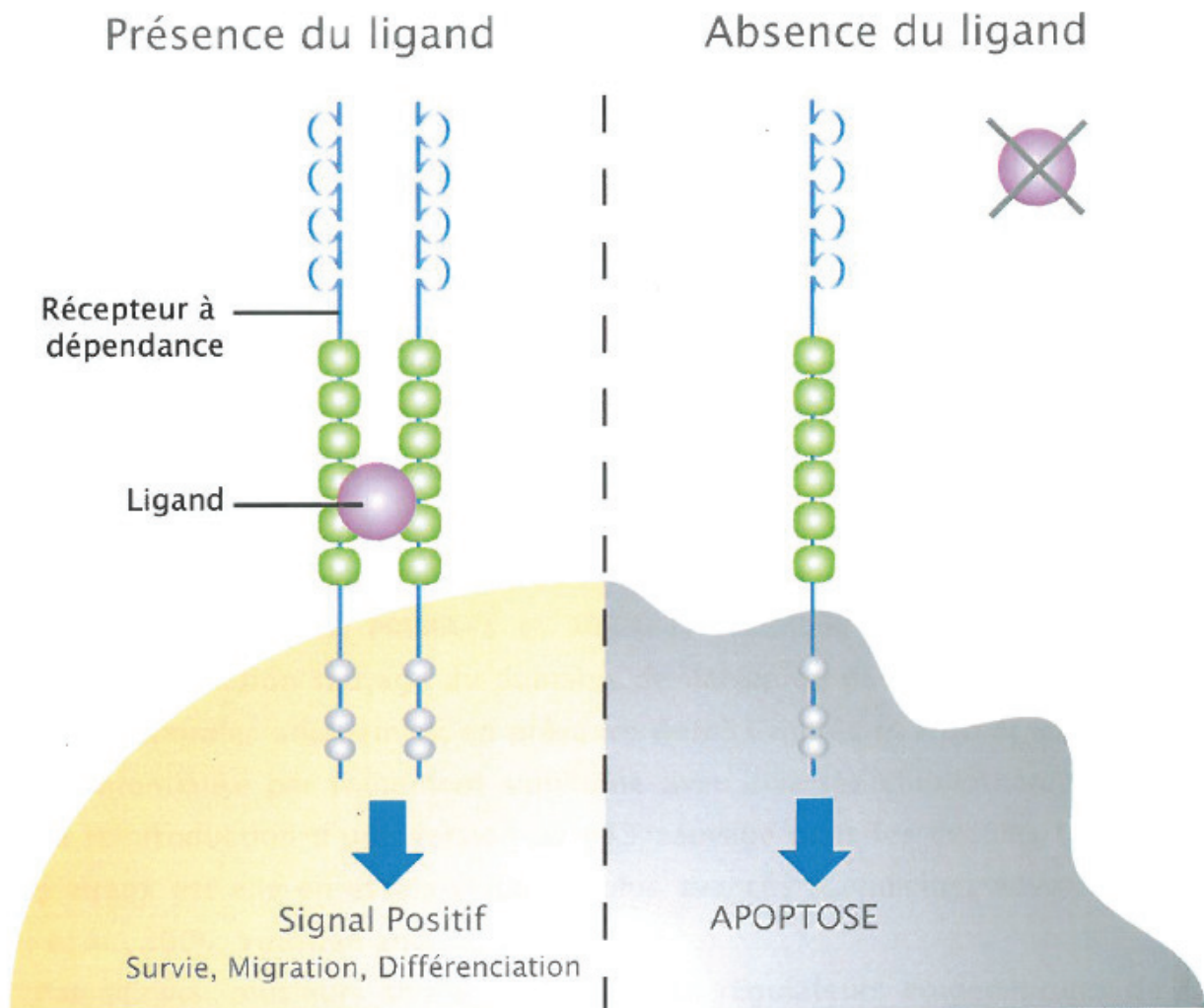


Figure 15 : Le concept des Récepteurs à dépendance.

Les récepteurs à dépendance, majoritairement transmembranaires, sont caractérisés par une double signalisation. En présence de leur ligand, ils induisent un signal positif permettant la survie, la prolifération, la migration et/ou la différenciation cellulaire. En l'absence de leur ligand, ils induisent une signalisation apoptotique conduisant à la mort de la cellule. Ils créent donc un état de dépendance vis-à-vis du ligand pour survivre

La famille des récepteurs à dépendance comprend un certain nombre de récepteurs à tyrosine kinase (RTK) : RET (Rearranged during Transfection) dont le ligand est GDNF (Glial cell line-derived neurotrophic factor) (Bordeaux et al., 2000), MET, dont le ligand est HGF/SF (Tulasne et al., 2004), le récepteur orphelin ALK (Anaplastic Lymphoma Kinase) dont la fonction de récepteur à dépendance a été mise en évidence grâce à un anticorps (Mourali et al., 2006), TRKC dont le ligand est NT-3 (Tauszig-Delamasure et al., 2007), le récepteur EPHRIN-A4 dont le ligand est EPHRIN-B3 (Furne et al., 2009). Les derniers récepteurs ayant été caractérisés sont eux aussi des récepteurs à tyrosine kinase, il s'agit de TRKA, qui, comme P75^{NTR}, lie le NGF (Nikolietopoulou et al., 2010), et des récepteurs à l'insuline et à l'IGF-1 respectivement, IR et IGF-1R (Boucher et al., 2010) (Figure 16).

Les récepteurs à dépendance ont en commun d'être impliqués à la fois dans le développement du système nerveux et dans des processus de développement tumoral. La double signalisation induite par les récepteurs à dépendance, « voie positive » de survie, prolifération, différenciation, guidage axonal en présence du ligand et « voie négative » d'apoptose en absence de ligand est particulièrement délicate à étudier. Néanmoins, ces dix dernières années, différentes études ont permis d'élucider la signalisation pro-apoptotique induite par certains récepteurs à dépendance.

2.2 – L'apoptose induite par les récepteurs à dépendance

2.2.1 - Les différentes voies apoptotiques

La survenue naturelle de la mort cellulaire a été observée il y a plus d'un siècle, et a longtemps été considérée comme un phénomène passif, inévitable pour les cellules vieillissantes. Cette vision du phénomène a commencé à être remise en cause quand des études ont montré que des inhibiteurs de la synthèse d'ARN et de protéines bloquaient cette mort cellulaire, ce qui démontrait que des processus intra-cellulaires actifs sont requis pour la mort de ces cellules (Martin et al., 1988). Un second tournant dans la compréhension de cet événement est venu de l'étude ultra-structurale réalisée par Kerr, Wyllie et Currie, décrivant pour la première fois les changements morphologiques des cellules en train de mourir (Kerr et al., 1972). Lors de la nécrose, qui fait souvent suite à une agression, le volume cellulaire augmente, puis la membrane cellulaire perd son intégrité et éclate déversant le contenu du cytoplasme dans le tissu environnant, provoquant localement une inflammation. Au contraire, lors de l'apoptose, ou mort cellulaire programmée, on observe une rétraction des cellules, une condensation des noyaux, une conservation de l'intégrité membranaire, et éventuellement une élimination par phagocytose. Ce sont des études chez le nématode *C. elegans* qui ont permis d'élucider la cascade de signalisation apoptotique. Les mutations affectant la mort cellulaire programmée ont permis l'identification du cœur du mécanisme d'apoptose, très conservé entre les espèces, et dont les caspases sont l'effecteur principal (Ellis & Horvitz, 1986).

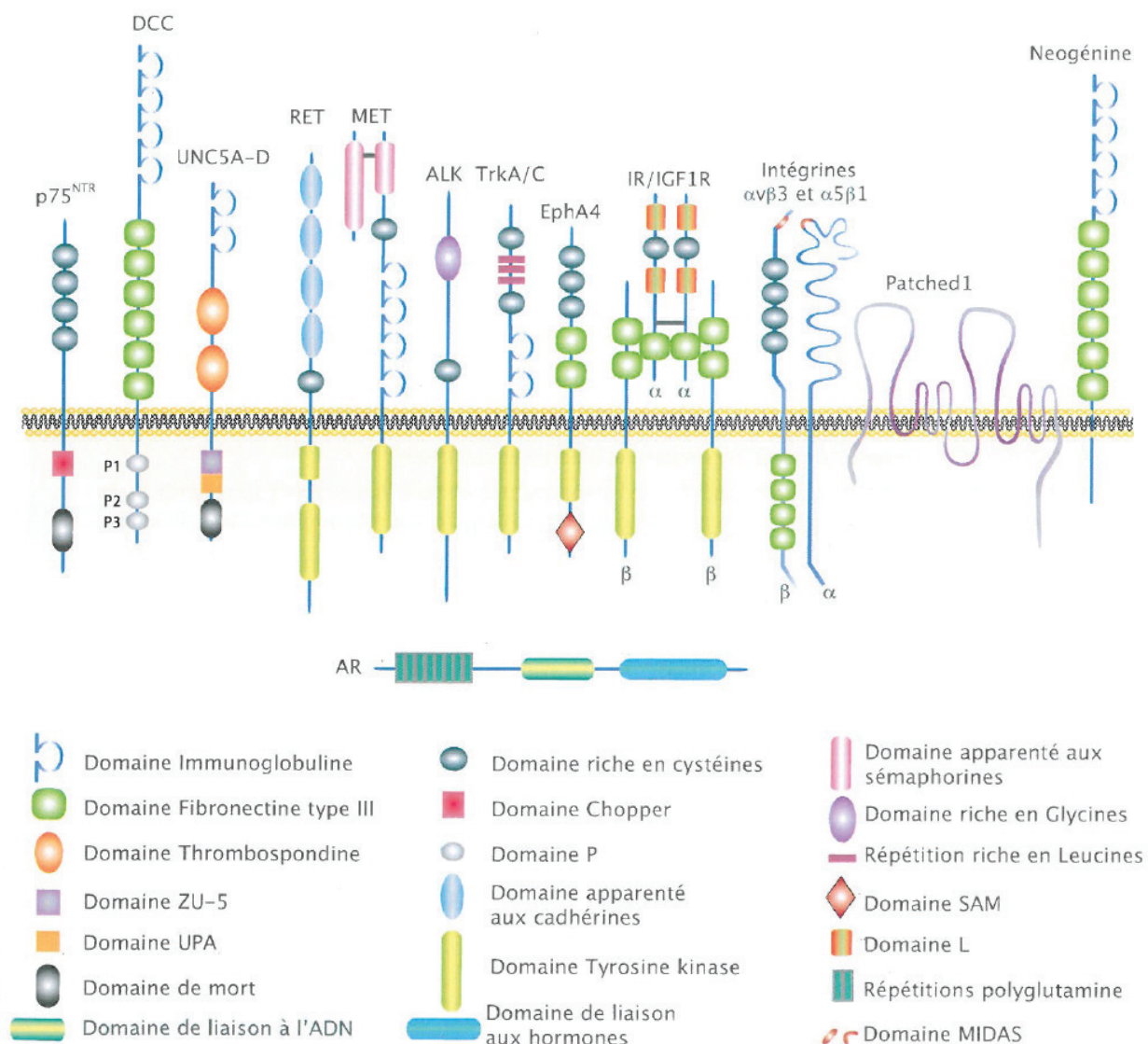


Figure 16 : La famille actuelle des récepteurs à dépendance.

Les récepteurs à dépendance sont pour la majorité transmembranaires, à l'exception du Récepteur aux Androgènes (AR). On note la diversité de structure des récepteurs qui illustre le fait que les récepteurs constituent une famille plus fonctionnelle que structurale. *TU* : Zona occludens/UNC5 homology domain ; *UPA* : UNC5, PIDD, Ankyrins ; *SAM* : Sterile Alpha Motif ; *MIDAS* : Metal Ion-Dependent Adhesion Site.

2.2.1.a – L'apoptose extrinsèque

Les termes de « voie apoptotique extrinsèque » sont utilisés pour décrire une mort cellulaire initiée par des signaux extra-cellulaires, et transmise à la cellule par des récepteurs spécifiques. Ces signaux inducteurs de mort incluent le ligand FAS/CD95 (FASL/CD95L), le facteur de nécrose tumorale TNF α (Tumor Necrosis Factor α) et le ligand induisant une apoptose liée au TNF, TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand). Ces ligands se lient respectivement à des récepteurs de mort tels que FAS/CD95, le récepteur au TNF (TNFR1) et les récepteurs TRAIL 1 et 2 (TRAILR) (Curtin and Cotter, 2003; Siegel, 2006; Thorburn, 2004) (Figure 17).

Pour illustrer cette voie intrinsèque, la transduction du signal apoptotique par FASL/FAS va être détaillée à titre d'exemple. En l'absence de FASL, le récepteur FAS est présenté sous forme trimérique à la membrane plasmique. Il est alors stabilisé par le domaine du pré-ligand assemblé (pre-ligand assembly domain, PLAD) (Siegel et al., 2000). La liaison de FASL va ensuite induire un changement conformationnel au niveau des domaines intra-cellulaires des récepteurs trimérisés. Ce changement de conformation va permettre un recrutement d'un complexe multi-protéique dynamique appelé DISC (Death-Inducing Signaling Complex) (Schulze-Osthoff et al. 1998). Le complexe DISC recruté par FAS est composé de FADD (FAS-associated protein with a Death Domain), de plusieurs isoformes de C-FLIP (cellular FLICE-inhibitory protein), et des pro-caspases 8 ou 10. De plus, le complexe DISC sert de plateforme activatrice pour la caspase 8 (Schneider and Tschopp 2000). Dans les cellules de type I (comme les lymphocytes), la caspase 8 activée va catalyser le clivage protéolytique de la caspase 3 effectrice. Cette activation induira la mort de la cellule, indépendamment de la voie mitochondriale. Dans les cellules de type II (comme les cellules β du pancréas et les hépatocytes), la caspase 8 activée va cliver BID (BH3-Interacting Domain death agonist) générant ainsi tBID (BID tronqué), décrit pour perméabiliser la membrane mitochondriale (Galluzzi et al., 2012). Ainsi, la mitochondrie n'est pas requise par les cellules de type I pour la finalisation de la voie intrinsèque, tandis que les cellules de type II montrent des signes de perméabilisation de la membrane mitochondriale externe (Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization, MOMP). En effet, on observe chez les cellules de type II une perte du potentiel transmembranaire mitochondrial, et le relargage de protéines toxiques de l'espace inter-membranaire mitochondrial (Mitochondrial Inter-Membrane Space, IMS). Parmi ces protéines, le cytochrome c va s'assembler avec APAF1 et la pro-caspase 9 pour former l'apoptosome.

2.2.1.b – L'apoptose intrinsèque (mitochondriale)

La voie mitochondriale de l'apoptose peut être initiée par une grande variété de signaux de stress intracellulaires, tels que des dommages à l'ADN, l'accumulation de protéines mal-conformées dans le réticulum endoplasmique (RE), une surcharge cytosolique en Ca²⁺, une

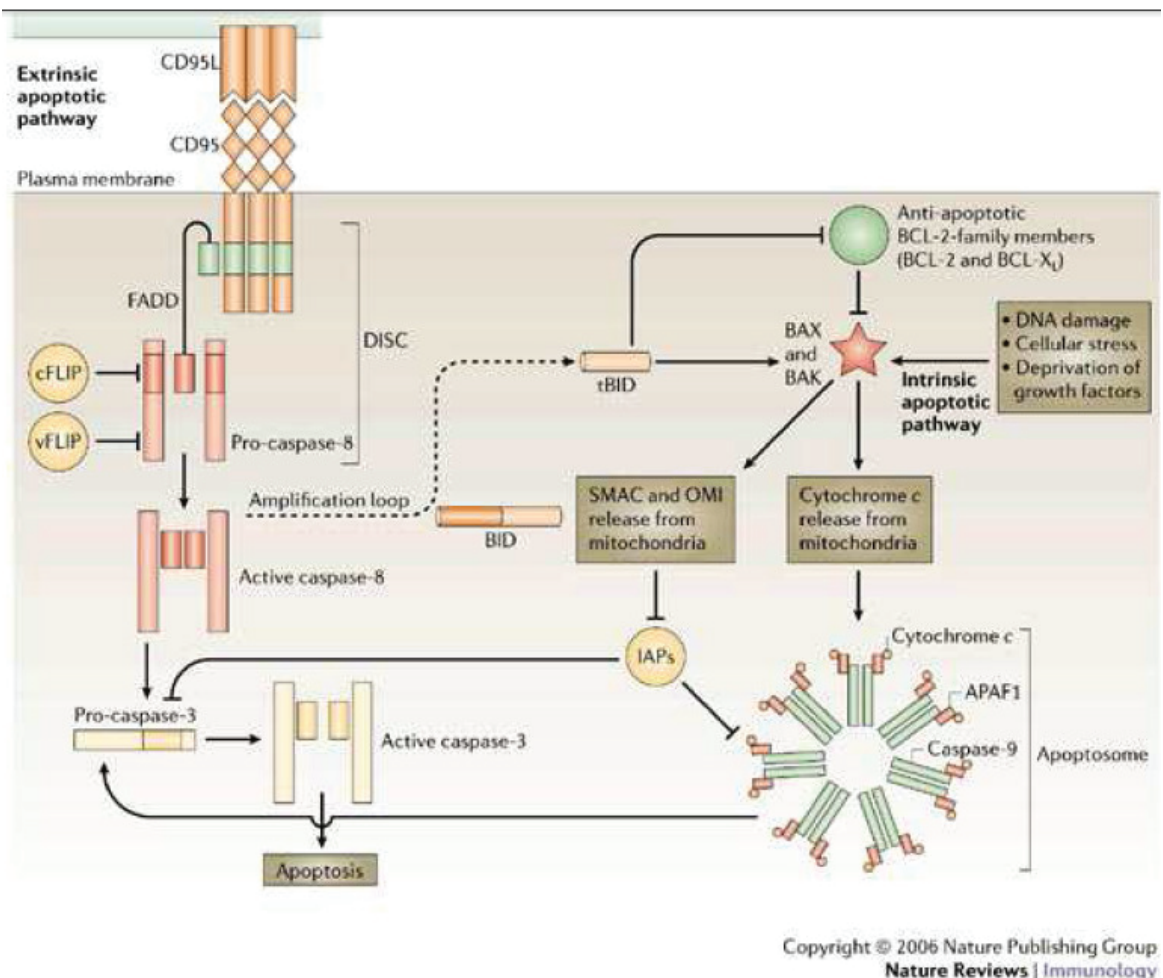


Figure 17 : Les voies d'apoptose extrinsèque et intrinsèque (mitochondriale).

Les termes de « voie apoptotique extrinsèque » sont utilisés pour décrire une mort cellulaire initiée par des signaux extra-cellulaires, et transmise à la cellule par des récepteurs spécifiques tel que le récepteur CD95. La fixation de son ligand CD95L entraîne le recrutement du complexe multi-protéique DISC, qui va activer l'activation en cascade des caspases qui conduira à l'apoptose cellulaire.

La voie intrinsèque (mitochondriale) de l'apoptose peut être initiée par une grande variété de signaux de stress intracellulaires, tels que des dommages à l'ADN, l'accumulation de protéines mal-conformées dans le réticulum endoplasmique (RE), une surcharge cytosolique en Ca^{2+} , une déprivation en neurotrophines, ... En dépit de la diversité de ces stimuli pro-apoptotiques, ils sont tous dirigés vers la mitochondrie, où une Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization (MOMP) va survenir, qui va libérer des facteurs apoptotiques tels que le cytochrome c, OMI, ... Ces derniers vont induire l'assemblage de l'apoptosome et l'activation des caspases effectrices.

(Siegel, 2006).

déprivation en neurotrophines, ... En dépit de la diversité de ces stimuli pro-apoptotiques, ils sont tous dirigés vers la mitochondrie, où une Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization (MOMP) va survenir (Tait & Green 2010). La MOMP peut être due soit à la formation de pores par les protéines pro-apoptotiques BAK et BAX (Antignani & Youle 2006), soit à un changement de perméabilité mitochondriale (Mitochondrial Permeability Transition, MPT), provenant de la membrane interne (Brenner & Grimm 2006). La MOMP est le point de départ de nombreux événements létaux : la perte du potentiel transmembranaire mitochondrial est suivi par l'arrêt de la synthèse d'ATP et la libération du cytochrome c, du facteur inducteur d'apoptose (Apoptosis-Inducing Factor, AIF), de l'endonucléase G (EndoG), DIABLO/SMAC et OMI (ou High Temperature Requirement protein A2, HTRA2) (Kroemer et al., 2007) (Figure 17).

Après la MOMP, le cytochrome c induit l'assemblage de l'apoptosome, ce qui va déclencher l'activation des caspases 9 et 3 (Tait & Green 2010). Les protéines toxiques AIF et EndoG sont transportées dans le noyau où elles entraînent la fragmentation de l'ADN (Liet al., 2001; Susin et al. 1999) tandis que SMAC/DIABLO et OMI se lient à plusieurs inhibiteurs de l'apoptose (Inhibitors of Apoptosis, IAP), bloquant leur fonction anti-apoptotique (Chai et al., 2000; Yang et al., 2003). Il est bien accepté que la MOMP tue les cellules en activant rapidement les caspases effectrices (mort dépendante des caspases). Cependant, en l'absence d'activité caspase (déficience en APAF1 ou caspase 9), les cellules peuvent subir une mort indépendante des caspases, probablement due aux protéines toxiques provenant de l'IMS (Tait & Green 2008).

Il est à noter qu'il existe bien d'autres types de mort cellulaire, telles que l'anoïkis, l'autophagie, l'entose, la nécrose, la nétose, la parthanose ou la pyroptose (Galluzzi et al. 2012), chacune avec leurs propres caractéristiques, mais elles ne seront pas décrites ici.

2.2.2- L'apoptose induite par les récepteurs à dépendance

Comme il a été décrit plus haut, dans des conditions où leur ligand est absent, les récepteurs à dépendance (RD) sont capables d'induire l'apoptose cellulaire de manière active. Au cours de ce processus, la plupart (à l'exception de TRKA et des intégrines) sont clivés par les caspases (ou d'autres protéases) au niveau de leur région intracellulaire. (Tableau DG revue).

Suite à ce clivage, selon le RD concerné, il existe alors deux possibilités : soit il y a relargage d'un fragment pro-apoptotique dans le cytoplasme, soit un domaine pro-apoptotique apparaît, auparavant masqué par la région C-terminale clivée. L'exposition de ce domaine intracellulaire va permettre le recrutement d'autres caspases et partenaires pro-apoptotiques, qui pourront potentiellement amplifier le signal de mort (Goldschneider and Mehlen, 2010; Mille et al., 2009a). Par exemple, dans le cas de DCC, il a été suggéré qu'en l'absence de son ligand la nétrine-1, un changement de conformation intracellulaire survient qui entraînerait le recrutement de la caspase-9 et l'activation de la caspase-3, mais la composition de ce complexe reste mal connue (Forcet et al., 2001). En revanche dans le cas de PATCHED, on sait qu'il y a interaction avec la protéine adaptatrice DRAL (Downregulated rhabdomyosarcoma LIM-domain protein), et

formation d'un complexe contenant également TUCAN ou NAPL1, qui sont des protéines possédant des domaines de recrutement des caspases (CARD domains), la E3-ubiquitine ligase NEDD4 et la caspase-9. Cette dernière va alors être activée par poly-ubiquitination et conduire à la mort cellulaire (Fombonne et al., 2012).

Le clivage des RDs est abrogé par des inhibiteurs de caspases (z.VAD.fmk, BAF). Cette inhibition est suffisante pour bloquer l'apoptose induite par les RDs (Goldschneider and Mehlen, 2010). De plus, une mutation des sites de clivage suffit à abolir la signalisation pro-apoptotique des RDs, ce qui confirme l'importance du clivage par les caspases dans cette fonction de mort des RDs. On remarque d'ailleurs que ces sites de clivage sont particulièrement conservés chez les mammifères.

L'apoptose induite par les RDs est bloquée par la présence de leur ligand respectif. Cette action inhibitrice peut être due soit à la protection du récepteur contre les caspases, soit à la répression en aval de protéines nécessaires à l'apoptose. Il est à noter que l'inhibition de l'activité pro-apoptotique des RDs par le ligand peut survenir avant mais aussi après le clivage par les caspases (Bredesen et al., 2005). La multimérisation de certains DRs a également été décrite comme étant requise pour induire la signalisation positive des récepteurs, comme c'est le cas pour RET ou DCC, mais comme étant également suffisante pour inhiber leur activité pro-apoptotique (Mille et al., 2009b) (Figure 18).

2.3- TRKC, un récepteur à dépendance

2.3.1 - TRKC, capable d'induire activement l'apoptose

L'étude de TRKC en tant que récepteur à dépendance a débuté par une recherche des récepteurs membranaires clivés par les caspases au niveau de leur domaine intracellulaire. Ceci étant une caractéristique commune à un grand nombre de récepteurs à dépendance. Il a ensuite été démontré qu'une expression ectopique de TRKC induisait l'apoptose dans plusieurs lignées cellulaires, et que l'ajout de son ligand NT-3 pouvait bloquer cette mort cellulaire (Tauszig-Delamasure et al., 2007). Cette activité pro-apoptotique est due au fragment 496-642 de TRKC, libéré lors du double clivage du domaine intracellulaire par les caspases, au niveau des résidus aspartiques D495 et D641. Du fait de sa forte activité pro-apoptotique, nous l'avons nommé "fragment tueur" (Killer Fragment, KF). Ce double clivage semble dépendre de la caspase-9 plutôt que de la caspase-8 (Tauszig-Delamasure et al., 2007). De plus, le clivage de TRKC a été observé *in vivo*, dans des neurones primaires sympathiques privés de NT-3. De manière intéressante, le domaine intracellulaire de TRKC, muté sur le site de clivage D641, agit comme un dominant négatif de l'apoptose induite par TRKC. Des données préliminaires montrent qu'il bloquerait le clivage du récepteur sauvage. La signification biologique du clivage de TRKC a été renforcée par une expérience montrant que des neurones primaires des DRGs, cultivés en l'absence de NT-3, n'entrent pas en apoptose quand ils ont été micro-injectés avec le dominant négatif de TRKC. Ces

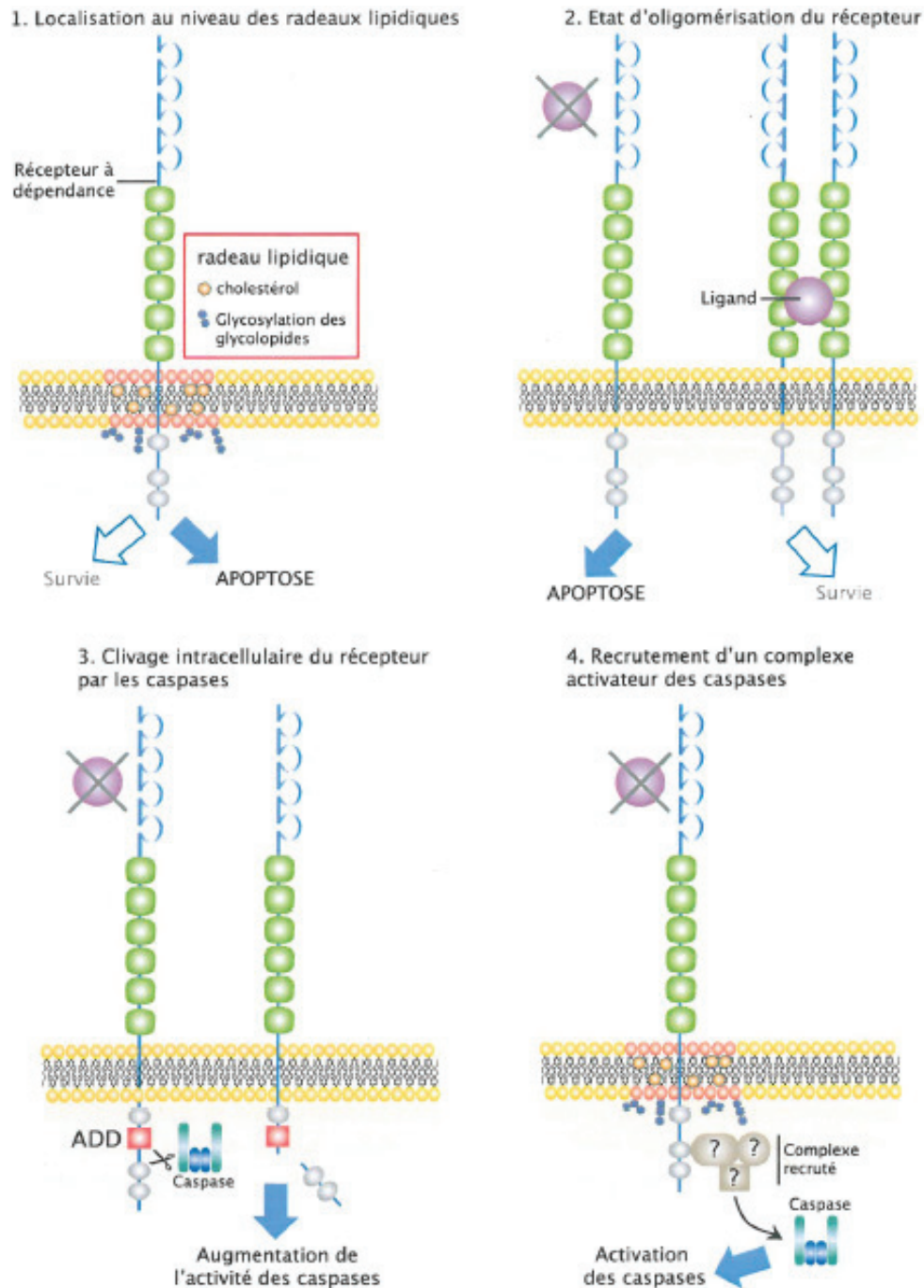


Figure 18 : Mécanismes moléculaires apoptotiques potentiellement communs aux récepteurs à dépendance.

En l'absence du ligand, l'apoptose induite par un récepteur à dépendance requerrait sa localisation au niveau des radeaux lipidiques membranaires (1), une modification de son état d'oligomérisation vers un état monomérique (2), le clivage de son domaine intracellulaire par des protéases de type caspases permettant l'amplification du signal apoptotique (3) et le recrutement de partenaires intracellulaires formant une plateforme d'activation des caspases, ou dépendosome (4).

résultats montrent clairement que la mort induite par la privation de NT-3 est un processus actif, initié par le récepteur TRKC lui-même. De plus, l'invalidation du TRKC endogène dans ces neurones, remplacé ensuite par une forme non-clivable du récepteur, protège ces neurones de l'induction d'apoptose par la privation en NT-3 (Tauszig-Delamasure et al., 2007).

2.3.2 - TRKC, la confirmation venue d'ailleurs

Une confirmation des travaux de notre laboratoire est venue de l'équipe de Yves-Alain Barde, qui a montré que TRKC, mais aussi TRKA, sont tous deux des récepteurs à dépendance (Nikoletopoulou 2010). Dans leur modèle expérimental, des cellules souches embryonnaires dans lesquelles le locus *tau* a été remplacé par TRKA, TRKB ou TRKC, sont différenciées en neurones glutaminergiques. Ils ont alors pu observer que, tandis que les neurones exprimant TRKB survivaient en l'absence de BDNF, ceux exprimant TRKA et TRKC mourraient *in vitro* en l'absence de leurs ligands respectifs. Pour valider cette fonction de récepteur à dépendance dans un modèle d'étude du développement du SNP (Système Nerveux Périphérique), une complémentation tétraploïde a été utilisée pour générer des embryons entièrement dérivés des cellules souches exprimant TRKA ou TRKC. A E13.5, le SNP des embryons exprimant TRKA ou TRKC disparaît de manière dramatique, tandis que celui des embryons exprimant TRKB est resté intact (Figure 19).

Ces résultats renforcent l'idée que les récepteurs de survie classique, comme TRKC et TRKA, peuvent se comporter comme des « récepteurs à dépendance », en induisant l'apoptose lorsqu'ils sont privés de leur ligand. Ceci ouvre une nouvelle perspective concernant la mort induite par la privation en neurotrophines. Celle-ci n'est donc pas toujours programmée « par défaut », mais peut être induite de façon active par les récepteurs TRKC ou TRKA eux-mêmes.

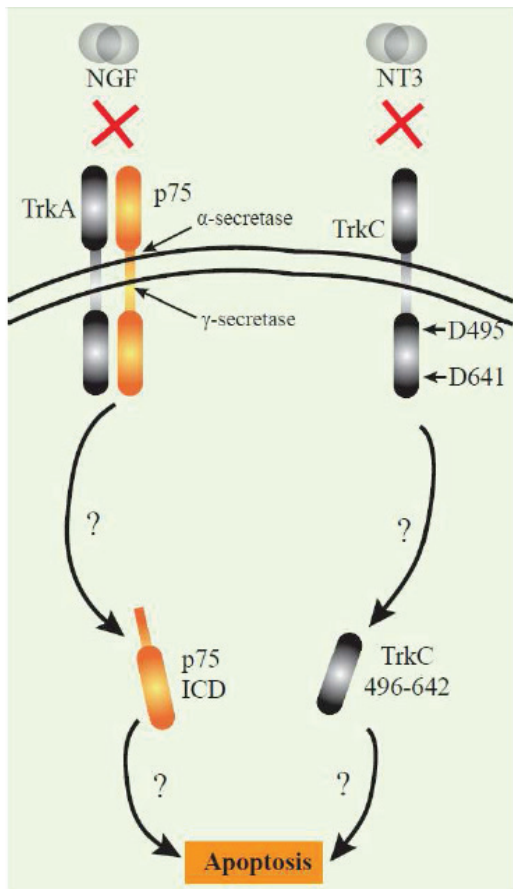


Figure 19 : TRKC et TRKA, des récepteurs à dépendance.

En l'absence de leurs ligands respectifs NT-3 et NGF, TRKC est clivé par les caspases, ce qui entraîne la libération d'un fragment pro-apoptotique, tandis que l'apoptose induite par TRKA semble requérir P75^{NTR}.

(Ichim, 2012).

IV- TRKC/NT-3, une cible thérapeutique en cancérogenèse

Initialement, les récepteurs à neurotrophines ont été identifiés comme étant des oncogènes. C'est le cas pour TRKA, décrit en premier lieu comme une protéine fusion avec le résidu amino-terminal d'une tropomyosine non-musculaire. Cette protéine de fusion, possédant le domaine kinase de TRKA activé de manière constitutive, a été retrouvée dans une fraction non négligeable des carcinomes colorectaux (Martin-Zanca et al., 1986). Plus récemment, une fusion entre ETV6 et TRKC a été caractérisée dans les fibrosarcomes congénitaux et la leucémie myéloïde (Eguchi et al., 1999; Knezevich et al., 1998). En tant qu'oncogènes, les récepteurs TRKs ont surtout été décrits dans des cancers aux origines neuronales et endocriniennes, même si leur expression aberrante a été rapportée dans d'autres types de cancers.

1- Implication du couple TRKC/NT-3 dans le neuroblastome

Le neuroblastome, un cancer issu du système nerveux sympathique, est le type de cancer solide le plus fréquent chez l'enfant (Henry et al., 2005). Deux types d'évolution radicalement opposées du neuroblastome sont observés : soit une régression spontanée, qui survient souvent chez l'enfant, soit une progression inexorable vers une situation à métastases multiples. Les neuroblastomes sont classifiés en 6 stades (1, 2A, 2B, 3, 4 et 4S), des tumeurs localisées donc opérables, à celles présentant une dissémination dans tout l'organisme (Siegel, 2002). Différents marqueurs génétiques ont été identifiés comme pouvant être corrélés avec l'évolution clinique du neuroblastome. L'un des principaux est l'amplification de l'oncogène *Mycn* dans les tumeurs agressives de mauvais pronostic (pour revue, Brodeur, 2003).

De manière intéressante, l'expression des récepteurs à neurotrophines est elle aussi corrélée avec l'issue de la maladie. Un taux d'expression élevé de *TrkA* est facteur de bon pronostic, tandis qu'une perte de *TrkA* associée à une amplification de *Mycn* a été décrite dans les cas de neuroblastomes agressifs (Nakagawara, 1998). On note aussi que la plupart des neuroblastomes expriment des niveaux très faibles, voir même indétectables, de NGF. A l'inverse, *TrkB* est hautement exprimé dans les tumeurs agressives, de même que ses ligands *Bdnf*, *Nt-4* et *Nt-5*. Leur présence semble stimuler la prolifération cellulaire cancéreuse et la formation de métastases (Matsumoto et al., 1995). De plus, la hausse du taux d'expression de *TrkB* et *Bdnf* dans le neuroblastome est associée à des phénomènes de résistance thérapeutique, probablement dus à une sur-activation de la signalisation de survie PI3K/AKT (Ho et al., 2002). *TrkC* est quant à lui plutôt exprimé dans les neuroblastomes dont l'issue est favorable au patient. Ces tumeurs sont également corrélées à une survenue précoce, à un stade moins agressif et à une absence d'amplification de *Mycn* (Brodeur, 2009). C'est dans ce contexte qu'une étude récente de l'équipe de P. Mehlen a montré l'augmentation d'expression de *Nt-3*, dans une large part des neuroblastomes agressifs de stade 4. Cette production autocrine de ligand bloque l'apoptose

induite par TRKC, et favorise la survie et la dissémination des cellules cancéreuses (Bouzas-rodriguez et al., 2010).

2 - Implication du couple TRKC/NT-3 dans le médulloblastome

Les médulloblastomes représentent 20 à 25% des tumeurs du système nerveux central (SNC) chez les enfants âgés de moins de 18 ans (Pomeroy et al., 1997). Originaire du cervelet, le médulloblastome a une croissance agressive et métastase rapidement dans tout le système nerveux. De manière similaire à ce qui est observé dans le neuroblastome, une expression importante de *TrkC* est corrélée à une meilleure réponse thérapeutique (Segal et al., 1994). Des expériences de xénogreffes de lignées cellulaires de médulloblastome sur des souris nues, ont permis de mettre en évidence qu'une sur-expression de *TrkC* inhibait la croissance des tumeurs intra-cérébrales (Kim et al., 1999). De plus, il apparait que dans plusieurs cas de médulloblastomes, une expression ectopique de *TrkA* induit l'apoptose des cellules, apparemment par l'activation de la signalisation RAS (Nakagawara, 2001).

3 - Implication du couple TRKC/NT-3 dans d'autres types de cancer

L'expression de *TrkC* et *Nt-3* a été mesurée pour différents types de cancers, tels que le cancer du pancréas ou de la prostate (Ohta et al., 2001; Satoh et al., 2001; Weeraratna et al., 2000). De manière intéressante, les cellules épithéliales cancéreuses de pancréas et de la prostate sécrètent NT-3, ce qui favorise leur survie et leur prolifération. Cependant, il a également été montré que traiter ces cellules tumorales avec un anticorps ciblant NT-3, permet de réduire la croissance tumorale dans un modèle de xénogreffes de cellules cancéreuses pancréatiques chez la souris (Miknyoczki et al., 2002). Il est aussi à noter qu'une étude a montré que la présence de TRKC était un marqueur de bon pronostic dans le cancer du sein (Blasco-Gutiérrez et al., 2007).

Une part importante de mon travail de thèse a consisté à analyser l'expression de *TrkC* et *Nt-3* dans différents types de tumeurs, et à en étudier les implications. Je me suis ainsi intéressée en particulier à l'expression de *TrkC* et *Nt-3* dans les tumeurs du rein, du poumon et du colon. Concernant le cancer colorectal, nous avons récemment publié nos travaux, dans lesquels nous mettons en évidence une perte de l'expression de *TrkC* dans la grande majorité des tumeurs. Nous démontrons également que cette perte est due à une hyperméthylation du promoteur de *TrkC*. De plus, nous mettons en évidence que la ré-expression de *TrkC* entraîne la mort cellulaire et l'inhibition de la croissance tumorale (Genevois et al., 2013).

Cette thèse a eu pour objet de résoudre un paradoxe : TRKC est un récepteur à tyrosine kinase mais il a également été montré comme étant un facteur de bon pronostic dans certains cancers. Nous avons montré que la double signalisation induite par TRKC, en fonction de la disponibilité de son ligand, fait de lui un proto-oncogène pouvant avoir une activité de suppresseur de tumeurs.

Quand j'ai rejoint l'équipe « Récepteurs à dépendance, Cancer et Développement » en 2010, mon projet de thèse comportait plusieurs aspects.

- Le premier avait pour objectif d'étendre la preuve de concept précédemment établie au laboratoire, qui présente le couple NT-3/TRKC comme une cible thérapeutique potentielle. Cette preuve de concept a été démontrée dans le cas du neuroblastome, et a fait l'objet d'une publication dans *Journal of Clinical Investigation* (JCI) en 2010 : « Neurotrophin-3 production promotes human neuroblastoma cell survival by inhibiting TRKC-induced apoptosis. ». Mon objectif était d'étudier le rôle de TRKC comme récepteur à dépendance dans le contrôle d'autres types de cancers.
- Le second aspect, plus fondamental, avait pour but d'améliorer la compréhension de la cascade de signalisation négative par laquelle TRKC induit l'apoptose, en travaillant sur des partenaires potentiels de TRKC, issus d'un crible double-hybride.

Mon projet principal était donc d'étendre la preuve de concept établie dans le neuroblastome. Pour ce faire, j'ai étudié les profils d'expression de *TrkC* et *Nt-3* dans différents types de cancer. C'est ainsi que j'ai débuté mon travail sur la perte d'expression de *TrkC* dans le cancer colorectal. En effet, j'ai constaté une perte de l'expression de *TrkC*, tant au niveau ARNm que protéique, dans le tissu tumoral par rapport au tissu normal associé. Une analyse de la méthylation des îlots CpG et des histones de la région promotrice de *TrkC* a mis en évidence qu'une hyperméthylation du promoteur est à l'origine de cette perte d'expression de *TrkC* dans le tissu tumoral colorectal. Exprimer *TrkC* de manière ectopique dans des lignées colorectales tumorales m'a permis de démontrer son rôle suppresseur de tumeurs *in vitro*, mais aussi *in vivo* dans un modèle de xénogreffes chez le poulet. Cette perte d'expression de *TrkC* pourrait constituer une potentielle cible thérapeutique, s'il était possible de forcer la réexpression de *TrkC* afin qu'il exerce son rôle suppresseur de tumeurs. Or, dans des lignées tumorales de colon n'exprimant plus *TrkC*, j'ai pu induire sa réexpression grâce à des traitements par des inhibiteurs des DNA Méthyl Transferases (DNMTs) et des Histone DeAcetylases (HDACs), des drogues dont certaines sont actuellement incluses dans des essais cliniques. Ainsi, dans le cadre de ce projet, je me suis attachée à décrire TRKC dans un rôle inhabituel pour un récepteur à tyrosine kinase, celui de suppresseur de tumeurs conditionnel dans le cancer colorectal, une étude qui a donné lieu à une publication dans le journal *Proceedings of National Academy of Sciences* (PNAS), en janvier 2013 : « Dependence receptor TRKC is a putative colon tumor suppressor. » et que je signe en co-premier auteur.

Lors de l'établissement des profils d'expression de *TrkC* et *NT-3*, j'ai également obtenu d'autres résultats intéressants dans le cancer du rein. En effet, j'ai observé d'importantes variations de l'expression de *TrkC* et *NT-3* entre le tissu normal et le tissu tumoral associé, et j'ai

pu établir que selon le grade tumoral, environ 20% des patients, tandis qu'ils continuent d'exprimer *TrkC*, sur-expriment *NT-3* dans le tissu cancéreux par rapport au tissu normal associé. Comme cela a été montré dans le neuroblastome, cette boucle autocrine de production de NT-3 pourraient être ciblée par des agents interférant afin de bloquer la liaison de NT-3 avec TRKC, et induire l'apoptose des cellules cancéreuses. Ainsi, dans le cadre d'une approche thérapeutique, au moins 20% des patients pourraient bénéficier de cette thérapie ciblée.

Enfin, j'ai eu la chance de prendre part à un stimulant projet de recherche qui avait pour but d'élucider les mécanismes moléculaires de l'apoptose induite par TRKC. Le point de départ de cette étude a été un crible double-hybride chez la levure, qui a permis l'identification de partenaires potentiels du fragment de clivage de TRKC induisant l'apoptose (TRKC KF). Ce projet s'est focalisé sur l'un de ces partenaires potentiels : COBRA1, un cofacteur de BRCA1. Nous montrons dans cette étude que COBRA1 est un partenaire pro-apoptotique de TRKC KF, et que la mort induite par TRKC est dépendante de la voie apoptotique mitochondriale intrinsèque. Ce travail, dont je suis co-premier auteur, a fait l'objet d'une publication dans le journal *Molecular Cell* en septembre 2013 : « The dependence receptor TrkC triggers mitochondria-dependent apoptosis upon Cobra-1 recruitment ».

.

La totalité de mes résultats sont présentés ci-après ; mes deux articles publiés, suivis par les données non publiées de mes projets en cours.

1 – Article 1 : Le récepteur à dépendance TRKC est un suppresseur de tumeur potentiel dans le cancer du colon.

Dans cet article, nous analysons le rôle du récepteur à dépendance TRKC comme suppresseur de tumeur dans le cancer du colon. Le taux d'expression de *TrkC* a été analysé par qRT-PCR dans un panel de 45 échantillons de cancer colorectal versus le tissu normal associé. Nous avons constaté une perte d'expression de *TrkC*, jusqu'à dix fois moins exprimé dans le tissu tumoral que dans le tissu normal pour 60% des patients. Cette perte d'expression de *TrkC* a été retrouvée dans la majorité des lignées cellulaires colorectales analysées.

Dans le but d'élucider les mécanismes responsables de cette inhibition de l'expression de *TrkC*, nous avons analysé par pyroséquençage le statut de méthylation du promoteur de *TrkC*. De manière intéressante, le promoteur de *TrkC* présente une augmentation importante de la méthylation au niveau de ses sites CpGs, dans les échantillons tumoraux par rapport au tissu normal. On retrouve cette méthylation marquée du promoteur de *TrkC* dans les lignées tumorales colorectales analysées. Dans un raisonnement inverse, un traitement de ces lignées avec un agent déméthylant, la 5-aza-2'-deoxycytidine, restaure l'expression de *TrkC*.

De plus, l'expression ectopique de *TrkC* dans plusieurs lignées de cellules colorectales permet une ré-induction de l'apoptose cellulaire, associée à une inhibition de la croissance indépendante de l'ancrage et de la capacité à migrer. Pour aller plus loin et analyser *in vivo* l'activité suppresseur de tumeurs de TRKC, des cellules HCT116 exprimant ou non *TrkC*, on été xénogreffées sur la membrane chorio-allantoïdienne d'embryons de poulet. De manière intéressante, la taille des tumeurs dérivant de cellules exprimant *TrkC* était significativement plus petite que celle des tumeurs dérivées des cellules contrôles, et un marquage TUNEL a montré que les cellules en apoptose étaient plus nombreuses dans les tumeurs exprimant *TrkC*. La présence de NT-3 permet de supprimer l'inhibition de la croissance tumorale par TRKC, ce qui renforce l'idée que TRKC puisse jouer un rôle de suppresseur de tumeurs conditionnel dans le cancer colorectal.

Dependence receptor TrkC is a putative colon cancer tumor suppressor

Anne-Laure Genevois^{a,1}, Gabriel Ichim^{a,1}, Marie-May Coissieux^a, Marie-Pierre Lambert^b, Fabrice Lavial^a, David Goldschneider^a, Loraine Jarrosson-Wuilleme^a, Florian Lepinasse^c, Géraldine Gouysse^c, Zdenko Herceg^b, Jean-Yves Scoazec^c, Servane Tauszig-Delamasure^{a,2}, and Patrick Mehlen^{a,2,3}

^aApoptosis, Cancer and Development Laboratory, Equipe labellisée "La Ligue," LabEx DEVweCAN, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Unité 1052, Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche 5286, Université de Lyon, Centre Léon Bérard, 69008 Lyon, France; ^bEpigenetics Group, International Agency for Research on Cancer, 69008 Lyon, France; and ^cEndocrine Differentiation Laboratory, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Unité 1052, Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche 5286, Université de Lyon, Hospices Civils de Lyon, Hôpital Edouard Herriot, Anatomie Pathologique, 69437 Lyon, France

Edited[†] by Albert de la Chapelle, Ohio State University Comprehensive Cancer Center, Columbus, OH, and approved December 7, 2012 (received for review July 19, 2012)

The TrkC neurotrophin receptor belongs to the functional dependence receptor family, members of which share the ability to induce apoptosis in the absence of their ligands. Such a trait has been hypothesized to confer tumor-suppressor activity. Indeed, cells that express these receptors are thought to be dependent on ligand availability for their survival, a mechanism that inhibits uncontrolled tumor cell proliferation and migration. TrkC is a classic tyrosine kinase receptor and therefore generally considered to be a proto-oncogene. We show here that TrkC expression is down-regulated in a large fraction of human colorectal cancers, mainly through promoter methylation. Moreover, we show that TrkC silencing by promoter methylation is a selective advantage for colorectal cell lines to limit tumor cell death. Furthermore, reestablished TrkC expression in colorectal cancer cell lines is associated with tumor cell death and inhibition of *in vitro* characteristics of cell transformation, as well as *in vivo* tumor growth. Finally, we provide evidence that a mutation of TrkC detected in a sporadic cancer is a loss-of-proapoptotic function mutation. Together, these data support the conclusion that TrkC is a colorectal cancer tumor suppressor.

neurotrophin-3 | caspase-3 | genetic | epigenetic

The Trk tyrosine kinase receptors and their ligands, the neurotrophins, have been studied extensively for their role in nervous system development. However, TrkA was originally cloned as an oncogene from colon carcinoma tumors in which the TrkA kinase domain was fused to the tropomyosin gene in the extracellular domain (1). This discovery motivated a great number of studies, which showed that neurotrophins (NGF, BDNF, and NT-4/5, NT-3) and their respective Trk receptors (TrkA, TrkB, and TrkC), are all involved in various malignancies (for review, see ref. 2). The initial (and still generally accepted) view is that Trks, like other tyrosine kinase receptors, are oncogenic receptors, and therefore pan-Trk kinase inhibitors are currently being tested in clinical trials (3–5). Somewhat surprisingly, however, it has turned out that, at least in tumors such as neuroblastoma and medulloblastoma, TrkA, TrkB, and TrkC behave very differently, despite their close homology. TrkA and TrkC expression is associated with a good prognosis, whereas TrkB is expressed in very aggressive tumors (for review; see ref. 2). The fact that the high expression of a tyrosine kinase receptor known to activate prooncogenic pathways (like the MAPK and PI3K-AKT pathways) is associated with a better outcome is counter intuitive, and suggests the possibility that TrkA and TrkC, rather than functioning solely as oncogenes, may also, in at least some cases, act as tumor suppressors. Although this notion may be ostensibly paradoxical, two recent independent studies have lent support to it, by demonstrating that both TrkA and TrkC, but not TrkB, act as dependence receptors (6, 7).

Dependence receptors, which also include DCC (Deleted in Colorectal Carcinoma), UNC5H, Patched, Neogenin, and the RET, EPHA4, IR, IGF1R, and Alk tyrosine kinase receptors (8–14), share the functional property of inducing cell death when disengaged

from their ligands, but suppressing their proapoptotic activity when bound by their respective trophic ligands. These receptors thus create cellular states of dependence on their respective ligands (15, 16). The molecular mechanisms used by these unbound receptors to trigger apoptosis are in large part unknown (15, 16), but it has been hypothesized that this characteristic acts as a means of eliminating tumor cells that would otherwise proliferate in settings of ligand unavailability, such as exist for invasive or metastatic neoplasms. The proapoptotic activity of dependence receptors has thus been proposed to confer a tumor suppressor activity that is in turn suppressed by the presence of trophic ligands. This was formally demonstrated for the prototype dependence receptors DCC and UNC5H3/C, which bind the ligand netrin-1 (16). Both DCC and UNC5C have been suggested to be colon cancer tumor suppressors because their expression is lost or markedly decreased in the vast majority of colorectal cancers (17–20). Moreover, inactivation of UNC5C or specific inactivation of DCC's proapoptotic activity in mice was shown to promote intestinal tumor progression (20, 21). Moreover, it was recently shown that missense mutations in UNC5C are associated with risk of familial colorectal cancer (22). As expected for a receptor that triggers apoptosis in settings of ligand limitation, tumor survival may be achieved not only by downregulating the proapoptotic receptor but also by autocrine production of the associated ligand. In support of this prediction, it was shown that in several cancers, such as metastatic breast cancer, lung cancer, and neuroblastoma, netrin-1 is produced in an autocrine manner to block netrin-1 receptor-induced apoptosis (23–25).

Interestingly, NT-3, the ligand for TrkC, has also been shown to be up-regulated in neuroblastoma, potentially inhibiting TrkC-induced apoptosis (26). Therefore, we tested the hypothesis that TrkC functions as a suppressor of colorectal malignancies, in an analogous fashion to the netrin-1 receptors. We demonstrate here that expression of the *TrkC* gene is down-regulated in colorectal cancers, primarily because of tumor-associated specific promoter methylation. We also show that, in colorectal cancer cell lines, re-expression of TrkC is associated with cancer cell death and loss of traits of cell transformation *in vitro*. We also show that TrkC expression constrains tumor growth in an avian model. Altogether, our data support the conclusion that TrkC is a colorectal cancer tumor suppressor.

Author contributions: A.-L.G., G.I., M.-M.C., M.-P.L., F. Lavial, D.G., F. Lepinasse, S.T.-D., and P.M. designed research; A.-L.G., G.I., M.-M.C., M.-P.L., F. Lavial, D.G., L.J.-W., F. Lepinasse, and S.T.-D. performed research; A.-L.G., G.I., M.-M.C., M.-P.L., F. Lavial, D.G., L.J.-W., G.G., Z.H., J.-Y.S., S.T.-D., and P.M. analyzed data; G.G., Z.H., and J.-Y.S. contributed new reagents/analytic tools; and S.T.-D. and P.M. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

[†]This Direct Submission article had a prearranged editor.

¹A.-L.G. and G.I. contributed equally to this work.

²S.T.-D. and P.M. contributed equally to this work.

³To whom correspondence should be addressed. E-mail: patrick.mehlen@lyon.univcancer.fr.

This article contains supporting information online at www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1212333110/-DCSupplemental.

Results

Expression of TrkC Is Down-Regulated in Human Colorectal Cancers.

TrkC has been shown to be expressed by epithelial cells (27). We therefore assessed TrkC gene expression by quantitative real-time reverse transcriptase PCR (Q-RT-PCR) in a panel of 45 colorectal cancers, and compared the results to those from corresponding matched normal tissues. As shown in Fig. 1A, although expression of TrkC was variable but relatively high in most normal tissues, a markedly decreased expression was observed in matched tumors. A 10-fold decrease of TrkC expression was observed in over 60% of the tested tumors, and one-third of the tumors showed a 50-fold decrease in expression (Fig. 1B). Mean TrkC expression was more than 10-fold lower in normal tissues than in the corresponding neoplasms (Fig. 1C, $P < 0.001$). This marked TrkC decrease was found to be independent of the stage of the pathology, as it was similarly detected in stage I, II, III, and IV colorectal cancers (Fig. S1A). Furthermore, TrkC expression was reduced in tumors not only in comparison with adjacent normal tissue, but also in comparison with normal tissues from age-matched healthy patients (Fig. S1B).

To eliminate any potential bias due to heterogeneity in tumor samples that may exceed that in normal tissue samples, epithelial cells from tumors and normal tissue were laser microdissected and assessed for TrkC expression by Q-RT-PCR. In the 8 pairs of samples assessed, a striking decrease in TrkC expression was detected in tumor cells (Fig. 1D and Fig. S1C). The loss of TrkC in neoplastic tissue observed at the RNA level was confirmed at the protein level by TrkC immunohistochemistry on biopsy sections from 30 patients (Fig. 1E and F).

Whereas TrkC level was observed to be decreased markedly in colon cancer samples, we failed to detect a gain of NT-3 expression in these samples (Fig. S1D). This finding argues that, in contrast to neuroblastoma cells, which typically select a gain of

NT-3 to survive ligand limitation (26) in colon cancer, TrkC loss is preferentially selected.

TrkC expression was next analyzed in a panel of colorectal cancer cell lines. As shown in Fig. S1E, most colorectal cancer cell lines screened were either negative for TrkC or showed only a modest level of expression compared with the neuroblastoma cell lines IMR32 and CLB-Ge2, in which TrkC and its ligand NT-3 were shown to be expressed (26). In this study, we used colorectal cancer HCT116 and HCT8 cells as a model. We confirmed that, in HCT116 and HCT8 cells, TrkC was not detected by immunohistochemistry (Fig. S1F).

Taken together, these data support the view that, although TrkC is expressed in normal colon epithelium, TrkC is silenced in a large fraction of colon cancer samples and cell lines.

TrkC Expression Is Inhibited via Tumor-Associated TrkC Promoter Methylation.

In an effort to delineate the mechanisms that may underlie TrkC down-regulation in colon cancer cells, we first analyzed whether loss of heterozygosity (LOH) may occur at the TrkC locus. Using a restricted panel of colorectal cancers and matched normal tissues, and a series of microsatellite markers within the *TrkC* gene, we failed to observe any significant occurrence of LOH, supporting the view that TrkC down-regulation results from an alternative mechanism (Fig. S2A and B). Therefore, we transfected a TrkC promoter-luciferase reporter construct into HCT116 and HT29 TrkC-negative cells and into MDA-MB-436 TrkC-positive cells, and compared luciferase expression. As shown in Fig. S2C, the exogenous TrkC promoter was activated in both cell lines, supporting the view that TrkC silencing is not due to indirect modulation of regulators of TrkC transcription, but rather to a direct silencing of the endogenous TrkC promoter.

We thus analyzed whether TrkC expression in colorectal cancer cell lines is restored in the presence of a DNA methylation

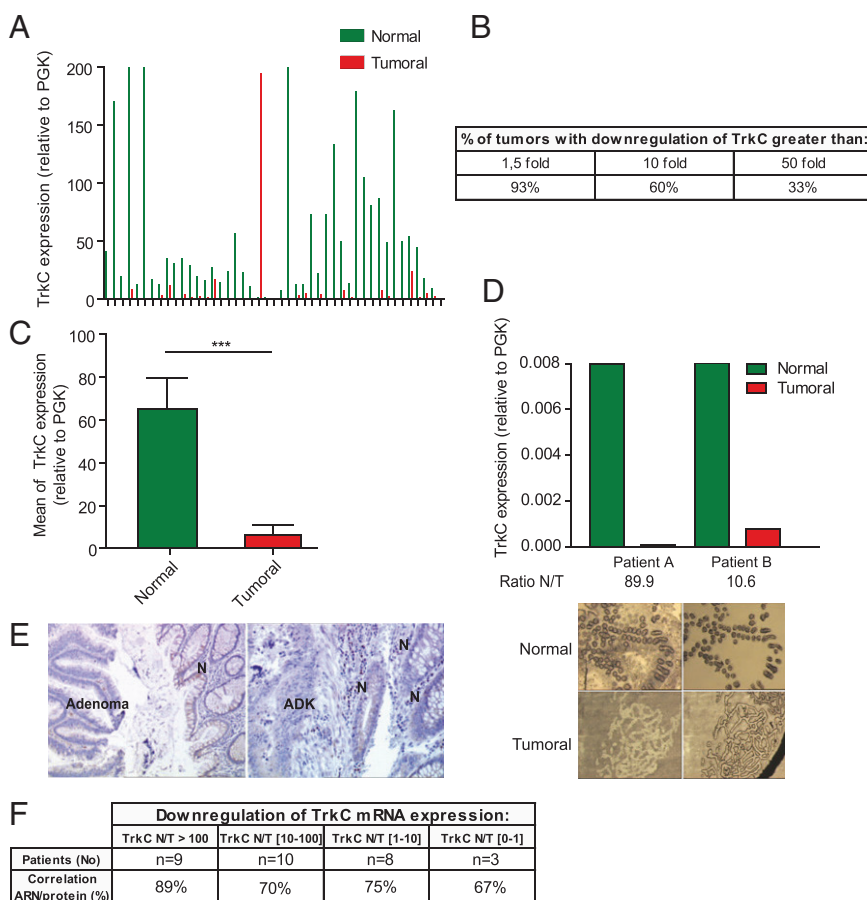


Fig. 1. TrkC expression is lost in colorectal tumors. (A–C) Quantitative real-time RT-PCR was performed using total RNA extracted from normal (N) and tumoral (T) tissues with specific human TrkC primers. PGK showing the less variability in their expression between normal and colorectal tumoral tissues, as described previously (20), was used as housekeeping gene. (A) The expression levels in 45 colorectal tumors (Tumoral) and corresponding normal tissue (Normal) are given as a ratio between TrkC and PGK, the internal control. (B) Table indicating the percentage of patients showing a loss of TrkC expression in tumor compared with normal tissue. (C) Mean TrkC expression in tumoral tissues versus normal tissues is presented. *** $P < 0.001$, two-sided Mann–Whitney test, the two means being compared. (D) Laser capture microdissection (LCM) was performed on 8 pairs of tumor/normal tissues (two representative pairs being presented here), and TrkC expression was determined as in A. (Upper) The expression levels in 2 colorectal tumors (T) and corresponding normal tissue (N) are given as a ratio between TrkC and PGK. (Lower) Typical microscopic visualization of LCM on colon section from human normal (N) or tumoral biopsies (T). Sections are shown before LCM (Left) and after LCM (Right), as the captured material is confirmed under microscopic visualization before processing for RNA extraction. (E) Immunostaining of TrkC protein was performed on tissue sections isolated from biopsies of two different patients and counterstained with Mayer's hematoxylin. N, normal tissue; ADK, adenocarcinoma. (F) Table showing the correlation between TrkC mRNA expression and TrkC protein expression determined by immunostaining in pair normal/tumor for 30 patients in the panel of 45 patients.

prominently inhibited growth in soft agar (Fig. 4A and Fig. S4A). Furthermore, by following the closure of a scratch performed in a HCT116 monolayer (Fig. 4B), or their migration through a transwell device (Fig. S4B), we observed that TrkC expression inhibited the migratory capacity of HCT116 cells. This observation is somewhat surprising, because one might expect forced expression of a tyrosine kinase receptor to promote anchorage-independent growth and migration. Concurrently, when the same anchorage-independent growth and migration assays were performed in the presence of the TrkC ligand NT-3, the TrkC effect was antagonized (Fig. 4A and B and Fig. S4B). Together, these data support the view that unliganded TrkC constrains colorectal cancer cell growth and migration, supporting the hypothesis that TrkC functions as a dependence receptor that is frequently down-regulated in colorectal malignancies.

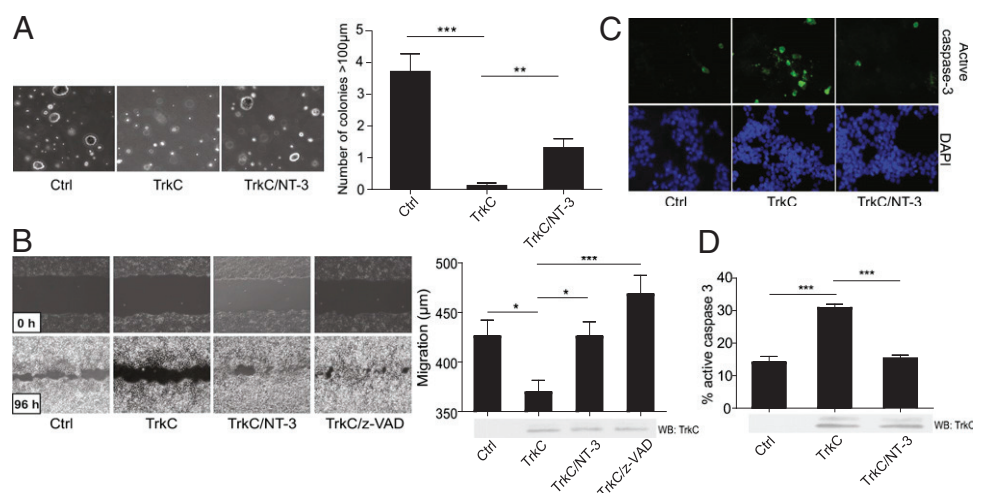
We next determined whether this *in vitro* tumor suppressive effect is related to the ability of TrkC to behave as a dependence receptor. As noted above, we observed that upon scratch or transwell assays, the inhibitory effect of enforced expression of TrkC was completely inhibited by addition of the general apoptosis inhibitor zVAD-fmk (Fig. 4B and Fig. S4B). TrkC was then expressed in HCT116 cells, and cell death was determined by following caspase-3 activation, either by measurement of caspase-3 substrate cleavage (Fig. S4A) or by cleaved caspase-3 immunostaining (Fig. 4C and D). As shown in Fig. 4C and D and Fig. S4C, enforced TrkC expression efficiently triggered HCT116 cell apoptosis, and the addition of NT-3 was sufficient to block TrkC-induced apoptosis. Similar results were obtained with the HCT8 TrkC-negative colon cancer cell line (Fig. S4D and E). Moreover, we observed that enforced expression of the TrkC domain that is necessary and sufficient to induce apoptosis, the so-called TrkC Killer Fragment (TrkC KF) (6), is sufficient to inhibit anchorage-independent growth to an extent similar to that of TrkC (Fig. S4C). Together, these data support the view that TrkC is a colon cancer tumor suppressor due to its dependence receptor activity.

To analyze the tumor suppressive activity of TrkC *in vivo*, HCT116 cells with or without enforced TrkC expression were xenografted to the chorioallantoic membrane (CAM) of 10-d-old chicken embryos (Fig. 5A). The CAM of chicken embryos is a well described model to study primary tumor growth and metastasis (25, 26, 32). Seventeen-day-old chicken embryos were analyzed for primary tumor size. As shown in Fig. 5B and C, tumors derived from the TrkC-transfected cells were significantly smaller than tumors derived from mock-transfected cells. TUNEL staining of the tumors revealed that the inhibition of tumor growth triggered by unliganded TrkC was associated with its proapoptotic activity, because an increased number of apoptotic cells was detected in

tumors derived from TrkC expressing cells compared with control tumors (Fig. 5D and E). Conversely, the presence of NT-3 completely suppressed the inhibitory activity of TrkC, supporting the view that TrkC functions as a colon cancer tumor suppressor *in vivo* by virtue of its dependence receptor effect.

TrkC Gene Is Mutated in Human Sporadic Cancer. The view that TrkC expression down-regulation is selected in most sporadic colorectal cancers, and that this down-regulation is associated with a reduction in tumor cell death, suggests the possibility that some sporadic cancers may exhibit specific loss-of-proapoptotic function mutations rather than overall down-regulation of TrkC. We therefore searched for putative *TrkC* gene mutations in the panel of tumors submitted to deep-sequencing and included in the Cosmic database (www.sanger.ac.uk/perl/genetics/CGP/cosmic?action=gene&ln=NTRK3) or described in ref. 33. As shown in Fig. S5A, somatic missense mutations of TrkC have been detected in gastrointestinal tract cancers. Of interest, several missense mutations were detected within the killer fragment of TrkC (amino acids 495–641), which also encompasses part of the TrkC tyrosine kinase domain (amino acids 538–839). Therefore, we determined whether these mutations were gain-of-function mutations constitutively inducing kinase activation (as classically observed for other tyrosine kinase receptors) or whether they represented instead loss-of-proapoptotic function mutations, as expected based on the dependence receptor paradigm. The various mutations shown in Fig. S5A were therefore introduced into a TrkC-expressing construct, focusing on the TrkC E543D and D584E mutations, and these were expressed in HCT116 cells and HCT8 cells (Fig. S5B). In both HCT116 (Fig. S5B and C) and HCT8 (Fig. S5D) cells, the E543D mutation did not affect TrkC proapoptotic activity; however, the expression of the TrkC E543D mutant constitutively induced Erk-1/2 activation, compared with wild-type TrkC (Fig. S5E). Thus, as expected for a tyrosine kinase receptor acting as a classical oncogene, the sporadic mutation E543D is most likely to be a gain-of-function mutation. In contrast, however, the D584E of TrkC did not affect Erk-1/2 activity (Fig. S5E) but completely abrogated TrkC proapoptotic activity (Fig. S5B–D). Furthermore, one of the detected mutations (TrkC E556*) is a nonsense mutation that truncated TrkC amino-terminally to most of its proapoptotic domain; in addition, we failed to detect any TrkC protein production when expressing D565H and D609V mutants. These data demonstrate that at least two different classes of tumor-associated TrkC mutants may be distinguished: those that result in a gain-of-oncogenic function, and those that result in a loss-of-proapoptotic-function, destroying the tumor-suppressive effect of TrkC.

Fig. 4. Re-expression of TrkC limits the hallmarks of colorectal cancer cells transformation via apoptosis induction. (A) Control, TrkC, or both TrkC and NT-3 overexpressing HCT116 cells were grown in soft agar for two weeks. The number of colonies was counted in five random fields and the average number per field was calculated. Data represent mean $\pm$ SEM. $*P < 0.05$, $***P < 0.001$, two-sided Mann–Whitney test, compared with control. Photographs of representative colonies for each condition are shown. (B) Scratch assay was performed on HCT116 cells expressing control vector and TrkC with or without NT-3 and z-VAD-fmk addition. The scratch open area was measured at 0 h and 96 h and the migration distance was determined. Representative photographs are shown. (C and D) Control, TrkC or both TrkC and NT-3 overexpressing HCT116 cells were immunolabeled for active caspase-3. Representative photographs are shown in C. The quantification and the corresponding Western blot controlling TrkC expression level are shown in D. $***P < 0.001$, two-sided Mann–Whitney test.



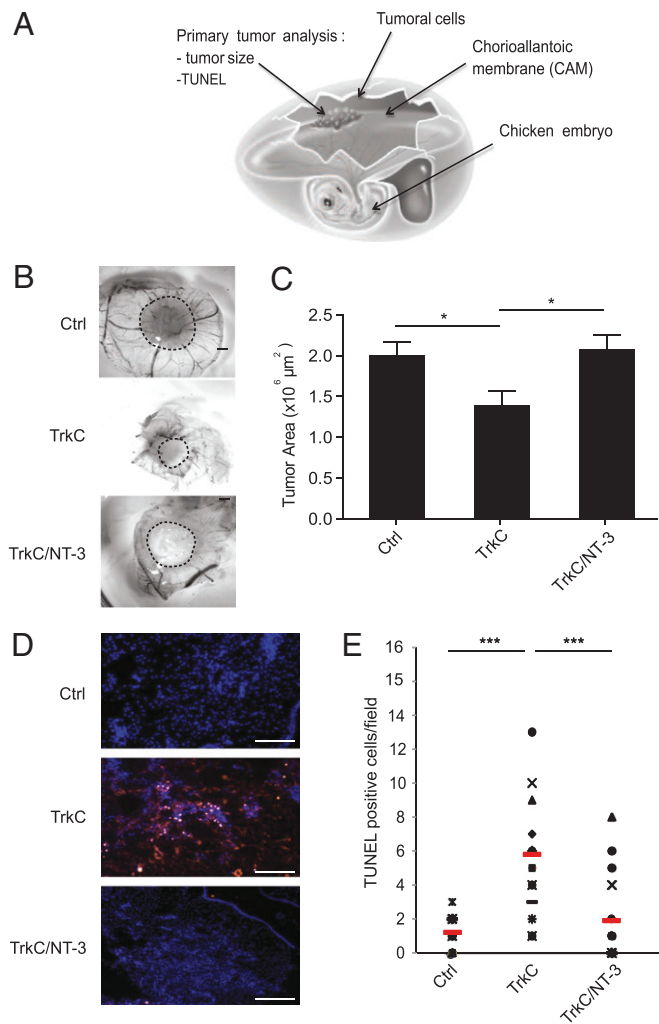


Fig. 5. TrkC expression induces tumor growth inhibition in vivo. (A) Schematic representation of the experimental chick model. HCT116 cells, transiently transfected with various plasmids, were grafted in CAM at day 10. Tumors were harvested on day 17, measured, and sectioned for TUNEL staining. $n = 10$ –15 for each condition. (B) Representative images of HCT116 primary tumors formed. HCT116 cells were either transfected with empty vector (Ctrl), TrkC and treated with NT-3 (10 ng/mL) or not, before graft. (Scale bar: 2 μm.) (C) Quantitative analysis showing the size of the respective primary tumors described in B; $*P < 0.05$, two-sided Mann–Whitney test. (D) Representative images of TUNEL-positive cells in sections performed on the respective primary tumors described in B. (Scale bar: 100 μm.) (E) Quantification of the TUNEL-positive cells described in D. The red bars indicate the respective mean of the various measures performed for each sample. $***P < 0.001$, two-sided Mann–Whitney test.

Discussion

Here we have presented evidence that TrkC is a colorectal cancer tumor suppressor, whose function is abrogated or strongly down-regulated in the vast majority of colorectal tumors. In support of the hypothesis that TrkC functions as a dependence receptor, we show that a reduction in TrkC expression allows survival in settings of NT-3 limitation, which may be a selective advantage for colorectal cancer cells. In human colorectal tumors, this selective advantage is achieved primarily by promoter methylation.

According to the dependence receptor theory, an equivalent selective advantage to losing TrkC would occur through a gain of autocrine expression of NT-3. However, whereas it was shown that in other neoplasms such as neuroblastomas, NT-3 is part of an autocrine loop that blocks TrkC-induced apoptosis (26), this mechanism is absent or rare in colon cancer. Why TrkC is down-

regulated in some tumors, such as colorectal cancer, whereas NT-3 expression is gained in others, remains to be investigated. Of interest, although the detected gain of NT-3 in some tumors could be interpreted as a classic oncogenic stimulation of a tyrosine kinase receptor, similarly to what is seen for many other oncogenic tyrosine kinase receptors (34, 35), the loss of TrkC expression in colorectal cancer clearly does not support the notion that TrkC functions solely as an oncogenic tyrosine kinase receptor. Instead, these findings support the view that TrkC is a tumor suppressor, and we present evidence both in vitro and in vivo that TrkC acts as a tumor suppressor via its dependence receptor function. Moreover, the expression of TrkC is a marker of favorable outcome in cancers of nervous tissue origin such as neuroblastoma (36, 37) and medulloblastoma (38, 39), in favor of the argument that in most cancers, TrkC is primarily a tumor suppressor, via its dependence receptor function, rather than a proto-oncogene via its tyrosine kinase activity. This does not hold true, however, for the translocation resulting in the ETV6 fusion to the intracellular domain of TrkC first reported in acute myeloid leukemia with $t(12, 15)(p13;q25)$ (40) and later also observed in breast carcinoma (41), T-cell lymphoma (42), and congenital fibrosarcoma (43, 44), for which the balance between TrkC proapoptotic activity and prokinase activity is probably shifted toward the prokinase activity.

Although the data presented here support the hypothesis that TrkC triggers apoptosis of cancer cells or precancerous cells in settings of ligand limitation, it may be of interest to compare the effects of TrkA expression to those of TrkC expression. Although TrkA has recently been shown to be a dependence receptor, triggering apoptosis in the absence of ligand (7), and although preliminary data support the view that TrkA expression is also decreased in colorectal cancer, TrkA, in contrast to TrkC, has been reported to induce apoptosis not only following NGF removal, but also in at least some cancer cell lines when engaged by NGF. For example, NGF treatment of TrkA-expressing medulloblastoma cells induces cell death (45), and pheochromocytoma PC12 cells expressing TrkA were rendered susceptible to cell death following NGF-treatment (46). Similarly, the expression of TrkA in rat glioma cell line reduced its invasiveness in correlation with a higher rate of apoptosis (47), whereas TrkA-transfected U2OS osteosarcoma cells also underwent cell death (48). These results with TrkA and NGF raise the question of whether TrkC functions as a tumor suppressor only via its dependence receptor activity, or whether NT-3 contributes to this activity. To date, we have not observed NT-3 mediated TrkC-induced apoptosis. Moreover, the absence of significant decrease of NT-3 expression in colon cancer supports the notion that the tumor-suppressive activity of TrkC is explained by its dependence receptor function.

Bardelli et al. (33) reported the spectrum of mutations within the kinase domain of tyrosine kinase proteins detected in sporadic colorectal cancers, with the view that these mutations were gain-of-function, oncogenic mutations. Interestingly, TrkC was one of the most frequently mutated kinases identified (33). That report, together with the recent effort in deep-sequencing of human tumors, demonstrates that TrkC displays a large spectrum of missense mutations. The large spectrum of mutations covering the entire TrkC coding sequence (Fig. S5) is a further argument in support of a role of TrkC as a tumor suppressor. Moreover, here we distinguish two classes of tumor-associated TrkC mutants: those acting as oncogenic mutants (such as TrkC E543D), and those acting to abrogate the TrkC proapoptotic effect. It remains to be investigated whether or not each member of this latter class of mutants affects the generation of the proapoptotic TrkC killer fragment, the recruitment of proapoptotic proteins to this killer fragment, or the TrkC protein stability. Ongoing deep-sequencing should reveal novel mutations of TrkC in neoplasms, and further work should determine whether these mutations are oncogenic-gain-of-function mutations or, as shown above, they are loss-of-proapoptotic-function mutations. We present data demonstrating that the TrkC dependence receptor is a colon cancer tumor suppressor and, as such, plays a similar role to DCC and UNC5H,

other dependence receptors whose expression is abrogated or markedly reduced in colorectal cancers (20, 22, 49). Similarly to what we observed for TrkC, promoter methylation is a mechanism that underlies colorectal cancer-associated down-regulation of DCC and UNC5H. This result is of particular interest in the light of the currently clinically tested inhibitors of methylation or of histone deacetylases that have an anticancer effect (for review, see ref. 50). Whether part of this efficiency is due to reactivation of DCC, UNC5H, or TrkC dependence receptor and associated apoptosis induction remains to be investigated.

Experimental Procedures

A full description of the experimental procedures is given in *SI Experimental Procedures*.

Analysis of Colorectal Samples. This study is based on 90 colorectal samples from a cohort of 45 patients. To assay TrkC expression in human colorectal samples, total RNA was extracted from biopsies of patients undergoing surgery for colorectal cancer. Q-RT-PCR was performed using standard procedures and primers as described in *SI Experimental Procedures*. Immunostaining of patient biopsies sections was performed with an anti-TrkC antibody. Sections were counterstained with a Mayer's Hematoxylin coloration.

Cell Lines, Treatment, Plasmids, TrkC Site-Directed Mutagenesis, and Transfection Procedure. Colorectal cancer cell lines HCT116, SW480, HT29, V9P, Caco-2, Colo320, HCT-15, SW48, SW620, SW116, SW480, ISP1, LS1034, SW837, and HCT8 have been described. The HCT116 double knockout for DNMT1 and DNMT3b (DKO) have been described and were kindly provided by B. Vogelstein (Ludwig Center at Johns Hopkins, Baltimore, MD) (30). The full-length TrkC expressing plasmid was described (6). Mutations were generated on the human TrkC gene using the QuikChange Site-Directed Mutagenesis kit (Stratagene). The plasmid constructs were transfected using JetPrime transfectant (PolyPlus) following manufacturer's instructions.

ACKNOWLEDGMENTS. We thank Prof. P. J. Donovan, Dr. H. Fong, Prof. P. H. Sorensen, and Prof. Y. A. Barde for materials; R. Dante, M. Grandin, G. Devailly, E. Dardenne, and B. Gras for important advice; H. Bilak and Prof D. E. Bredesen for editing the manuscript; C. Guix, A. S. Campos, P. A. Bissey, C. Cuenin, B. Boucher, and G. Grelier for technical help; and C. Rey in the ProfileXpert platform for the laser microdissection. This work was supported by institutional grants from Centre National de la Recherche Scientifique, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Centre Léon Bérard, and University of Lyon; and grants from the Ligue Contre le Cancer, Fondation pour la Recherche Médicale, Institut National du Cancer, l'Agence Nationale de la Recherche, Association pour la Recherche contre le Cancer, Cancéropole Rhone Alpes Auvergne, and the European Research Council.

- Martin-Zanca D, Hughes SH, Barbacid M (1986) A human oncogene formed by the fusion of truncated tropomyosin and protein tyrosine kinase sequences. *Nature* 319(6056):743–748.
- Nakagawara A (2001) Trk receptor tyrosine kinases: A bridge between cancer and neural development. *Cancer Lett* 169(2):107–114.
- Marshall JL, et al. (2005) Phase I trial of orally administered CEP-701, a novel neurotrophin receptor-linked tyrosine kinase inhibitor. *Invest New Drugs* 23(1):31–37.
- Knapper S, et al. (2006) A phase 2 trial of the FLT3 inhibitor lestauritinib (CEP701) as first-line treatment for older patients with acute myeloid leukemia not considered fit for intensive chemotherapy. *Blood* 108(10):3262–3270.
- Chan E, et al. (2008) A phase I trial of CEP-701 + gemcitabine in patients with advanced adenocarcinoma of the pancreas. *Invest New Drugs* 26(3):241–247.
- 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(33):13361–13366.
- Nikolopoulou V, et al. (2010) Neurotrophin receptors TrkA and TrkC cause neuronal death whereas TrkB does not. *Nature* 467(7311):59–63.
- Mehlen P, et al. (1998) The DCC gene product induces apoptosis by a mechanism requiring receptor proteolysis. *Nature* 395(6704):801–804.
- Matsunaga E, et al. (2004) RGM and its receptor neogenin regulate neuronal survival. *Nat Cell Biol* 6(8):749–755.
- Thibert C, et al. (2003) Inhibition of neuroepithelial patched-induced apoptosis by sonic hedgehog. *Science* 301(5634):843–846.
- Bordeaux MC, et al. (2000) The RET proto-oncogene induces apoptosis: A novel mechanism for Hirschsprung disease. *EMBO J* 19(15):4056–4063.
- Furne C, et al. (2009) EphrinB3 is an anti-apoptotic ligand that inhibits the dependence receptor functions of EphA4 receptors during adult neurogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1793(2):231–238.
- Boucher J, et al. (2010) A kinase-independent role for unoccupied insulin and IGF-1 receptors in the control of apoptosis. *Sci Signal* 3(151):ra87.
- Mourali J, et al. (2006) Anaplastic lymphoma kinase is a dependence receptor whose proapoptotic functions are activated by caspase cleavage. *Mol Cell Biol* 26(16):6209–6222.
- Goldschneider D, Mehlen P (2010) Dependence receptors: A new paradigm in cell signaling and cancer therapy. *Oncogene* 29(13):1865–1882.
- Mehlen P, Delloye-Bourgeois C, Chédotal A (2011) Novel roles for Slits and netrins: Axon guidance cues as anticancer targets? *Nat Rev Cancer* 11(3):188–197.
- Cho KR, et al. (1994) The DCC gene: Structural analysis and mutations in colorectal carcinomas. *Genomics* 19(3):525–531.
- Thiebaut K, et al. (2003) The netrin-1 receptors UNC5H are putative tumor suppressors controlling cell death commitment. *Proc Natl Acad Sci USA* 100(7):4173–4178.
- Mehlen P, Fearon ER (2004) Role of the dependence receptor DCC in colorectal cancer pathogenesis. *J Clin Oncol* 22(16):3420–3428.
- Bernet A, et al. (2007) Inactivation of the UNC5C Netrin-1 receptor is associated with tumor progression in colorectal malignancies. *Gastroenterology* 133(6):1840–1848.
- Castets M, et al. (2012) DCC constrains tumour progression via its dependence receptor activity. *Nature* 482(7386):534–537.
- Coissieux MM, et al. (2011) Variants in the netrin-1 receptor UNC5C prevent apoptosis and increase risk of familial colorectal cancer. *Gastroenterology* 141(6):2039–2046.
- Fitamant J, et al. (2008) Netrin-1 expression confers a selective advantage for tumor cell survival in metastatic breast cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 105(12):4850–4855.
- Delloye-Bourgeois C, et al. (2009) Interference with netrin-1 and tumor cell death in non-small cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 101(4):237–247.
- Delloye-Bourgeois C, et al. (2009) Netrin-1 acts as a survival factor for aggressive neuroblastoma. *J Exp Med* 206(4):833–847.
- Bouzas-Rodriguez J, et al. (2010) Neurotrophin-3 production promotes human neuroblastoma cell survival by inhibiting TrkC-induced apoptosis. *J Clin Invest* 120(3):850–858.
- Shibayama E, Koizumi H (1996) Cellular localization of the Trk neurotrophin receptor family in human non-neuronal tissues. *Am J Pathol* 148(6):1807–1818.
- Richon VM, Sandhoff TW, Rifkind RA, Marks PA (2000) Histone deacetylase inhibitor selectively induces p21WAF1 expression and gene-associated histone acetylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 97(18):10014–10019.
- Boyer LA, et al. (2006) Polycomb complexes repress developmental regulators in murine embryonic stem cells. *Nature* 441(7091):349–353.
- Rhee I, et al. (2002) DNMT1 and DNMT3b cooperate to silence genes in human cancer cells. *Nature* 416(6880):552–556.
- Hanahan D, Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* 100(1):57–70.
- Stupack DG, Puente XS, Boutsaboualoy S, Storgard CM, Cheresch DA (2001) Apoptosis of adherent cells by recruitment of caspase-8 to unligated integrins. *J Cell Biol* 155(3):459–470.
- Bardelli A, et al. (2003) Mutational analysis of the tyrosine kinome in colorectal cancers. *Science* 300(5621):949.
- Miknyoczki SJ, et al. (2002) The neurotrophin-trk receptor axes are critical for the growth and progression of human prostatic carcinoma and pancreatic ductal adenocarcinoma xenografts in nude mice. *Clin Cancer Res* 8(6):1924–1931.
- Ohta T, et al. (1997) Neurotrophin-3 expression in human pancreatic cancers. *J Pathol* 181(4):405–412.
- Svensson T, et al. (1997) Coexpression of mRNA for the full-length neurotrophin receptor trk-C and trk-A in favourable neuroblastoma. *Eur J Cancer* 33(12):2058–2063.
- Brodeur GM, Maris JM, Yamashiro DJ, Hogarty MD, White PS (1997) Biology and genetics of human neuroblastomas. *J Pediatr Hematol Oncol* 19(2):93–101.
- Grotzer MA, et al. (2000) TrkC expression predicts good clinical outcome in primitive neuroectodermal brain tumors. *J Clin Oncol* 18(5):1027–1035.
- Segal RA, Goumnerova LC, Kwon YK, Stiles CD, Pomeroy SL (1994) Expression of the neurotrophin receptor TrkC is linked to a favorable outcome in medulloblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 91(26):12867–12871.
- Eguchi M, et al. (1999) Fusion of ETV6 to neurotrophin-3 receptor TRKC in acute myeloid leukemia with t(12;15)(p13;q25). *Blood* 93(4):1355–1363.
- Tognon C, et al. (2002) Expression of the ETV6-NTRK3 gene fusion as a primary event in human secretory breast carcinoma. *Cancer Cell* 2(5):367–376.
- Yagasaki F, et al. (2001) Fusion of ETV6 to fibroblast growth factor receptor 3 in peripheral T-cell lymphoma with a t(4;12)(p16;p13) chromosomal translocation. *Cancer Res* 61(23):8371–8374.
- Dubus P, et al. (2001) The detection of Tel-TrkC chimeric transcripts is more specific than TrkC immunoreactivity for the diagnosis of congenital fibrosarcoma. *J Pathol* 193(1):88–94.
- Knezevich SR, McFadden DE, Tao W, Lim JF, Sorensen PH (1998) A novel ETV6-NTRK3 gene fusion in congenital fibrosarcoma. *Nat Genet* 18(2):184–187.
- Muragaki Y, Chou TT, Kaplan DR, Trojanowski JQ, Lee VM (1997) Nerve growth factor induces apoptosis in human medulloblastoma cell lines that express TrkA receptors. *J Neurosci* 17(2):530–542.
- Yan C, Liang Y, Nylander KD, Schor NF (2002) TrkA as a life and death receptor: Receptor dose as a mediator of function. *Cancer Res* 62(17):4867–4875.
- Lachyankar MB, et al. (1997) TrkA expression decreases the in vivo aggressiveness of C6 glioma cells. *Cancer Res* 57(3):532–536.
- Dadakhujav S, et al. (2009) Interplay between autophagy and apoptosis in TrkA-induced cell death. *Autophagy* 5(1):103–105.
- Shin SK, et al. (2007) Epigenetic and genetic alterations in Netrin-1 receptors UNC5C and DCC in human colon cancer. *Gastroenterology* 133(6):1849–1857.
- Ren J, et al. (2011) DNA hypermethylation as a chemotherapy target. *Cell Signal* 23(7):1082–1093.

Supporting Information

Genevois et al. 10.1073/pnas.1212333110

SI Experimental Procedures

Colorectal Samples. This study is based on 90 colorectal samples from a cohort of 45 patients. To preserve anonymity, a specific ID was attributed to each patient. For each sample, the tumoral tissue was paired with the adjacent normal tissue. The tumor stages (I–IV) were defined according to the TNM status of the tumors (American Joint Committee on Cancer Staging system) (1).

RNA Isolation and Quantitative Real-Time RT-PCR (Q-RT-PCR). To assay TrkC expression in human colorectal samples, total RNA was extracted from biopsies of patients undergoing surgery for colorectal cancer, using the Nucleospin RNAII kit (Macherey-Nagel). Five hundred nanograms of RNA were reverse-transcribed using the iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad). Real-time quantitative RT-PCR (Q-RT-PCR) was performed using a LightCycler 480 (Roche Applied Science) and the FastStart TaqMan Probe Master Mix (Roche Applied Science). Q-RT-PCR was performed using (i) probe #43 (Roche Applied Science) and the following primers: TrkC forward 5'-CAACTCTCAAACACG-GAGGTC-3' and reverse 5'-CCAGCATGACATCGTACACC-3'; (ii) probe #44 (Roche Applied Science) and the following primers: NT-3 forward: 5'-CCCTTGATATCTCATGGAGGATT-3' and reverse: 5'-TTTCCGCCGTGATGTTCT-3'. The ubiquitously expressed human gene PGK, showing the least variable expression between normal and colorectal tumoral tissues, was used as internal control, using probe # 42 (Roche Applied Science) and the following primers: forward 5'-CTGTGGCTTCTGGCATACT-3' and reverse 5'-CGAGTGACAGCCTCAGCATA. For all couples of primers, polymerase was activated at 95 °C for 10 min, followed by 45 cycles of amplification and 30 s of cooling. Moreover, the cohort has been previously validated using 11 other ordinarily housekeeping genes to strengthen the results: RxR α , PPIA, GAPDH, β -actin, Phosphoglycerokinase 1, β 2-microglobulin, hypoxanthine ribosyltransferase, TATA-box-binding protein, porphobilinogen deaminase (PBGD), transferrin receptor, and ribosomal protein large P0 (RPLP0).

Laser Capture Microdissection and Q-RT-PCR. Laser capture was performed under direct microscopic visualization using a Arcturus Pixcell II Laser Capture Microdissection system on 12- μ m-thick tissue frozen sections prepared from colon tumor and normal biopsies stained with cresyl violet (Ambion LCM staining kit; Life Technologies). Three nanograms of RNA underwent two rounds of linear amplification using the ExpressArt TRInucleotide mRNA amplification Nano kit, (AmpTec, Excilone). Reverse transcription of amplified RNA was performed with an iScript cDNA Synthesis kit (Bio-Rad). cDNA synthesis was carried out from 1 μ g of amplified cRNA.

Real-time Q-RT-PCR was performed on a LightCycler 2.0 apparatus (Roche), using the LightCycler FastStart DNA Master SYBER Green I kit (Roche). Q-RT-PCR was performed using the following primers: TrkC forward 5'-AGCTCAACAGCCA-GAACCTC-3' and reverse 5'-AACAGCGTTGTCACCCTCTC-3'. The ubiquitously expressed human PGK gene, showing the least variable expression in colon, was used as an internal control, using the following primers: forward 5'-CTGTGGCTTCTGGCATA-CCT-3' and reverse 5'-CTTGCTGCTTTCAGGACCC-3'. For all two couples of primers, polymerase was activated at 95 °C for 10 min, followed by 35 cycles at 95 °C for 10 s, 60 °C for 10 s, and 72 °C for 5 s.

LOH Analysis. The locus of TrkC has been studied with Repeat Masker. Single repeat microsatellites were used as markers to compare normal and tumor tissues using fluorescently labeled primers amplifying the DNAs from normal and tumoral tissue of 30 patients. All primers and PCR conditions are available upon request.

Cell Lines and Treatment. Colorectal cancer cell lines HCT116, SW480, HT29, V9P, Caco-2, Colo320, HCT-15, SW48, SW620, SW116, SW480, ISP1, LS1034, SW837, and HCT8 have been described. The HCT116 double knockout for DNMT1 and DNMT3b (DKO) have been described and were kindly provided by B. Vogelstein (Ludwig Center at Johns Hopkins, Baltimore, MD) (2). HCT116 wild-type and HCT116 DKO colorectal cell lines were maintained in Dulbecco's Minimum Essential Medium (DMEM) (Life Technologies), supplemented with 10% FCS (Lonza). HCT8 colorectal cell line was grown in RPMI (Life Technologies), supplemented with 10% fetal horse serum. HCT116 cells were treated with 5-Aza-2'-deoxycytidine (Sigma-Aldrich) (1–5 μ M) 24 h after plating, during 72 h. HCT116 cells were also treated with Histone DeAcetylase inhibitors (HDACi), SAHA and MS275 (Sigma-Aldrich) at a concentration range of 1–5 μ M, 24 h after plating, during 24 h. After treatment, cells were harvested and RNA was isolated for gene expression (Q-RT-PCR) analysis, as described above. HCT116 transfected cells were treated with recombinant NT-3 (Abcys) at 10 ng/mL, 24 h after plating.

Plasmids, Transfection Procedure, and Reagents. The full-length TrkC has been described (3). The plasmid constructs were transfected using JetPrime transfectant (PolyPlus) following manufacturer's instructions. The construct encoding the luciferase reporter gene under the control of TrkC promoter was a kind gift of P. J. Donovan and H. Fong (Sue and Bill Gross Stem Cell Research Center, University of California, Irvine, CA) and has been described (4).

TrkC Site-Directed Mutagenesis. Mutations were generated on the human TrkC gene using the QuikChange Site-Directed Mutagenesis kit (Stratagene). The mutation E543D was generated with the following primers: forward 5'-GCTGAAGCGAGACCTG-GGTGAGGGAG-3' and reverse 5'-CTCCCTCACCCAGGTC-TCGCTTCAGC-3'. The mutation D584E was generated with the following primers: forward 5'-GCCCCGAAGGAATTCC-AGAGGGAGG-3' and reverse 5'-CCTCCCTCTGGAATTC-CTCCCGGGC-3'.

Cell Death Assays. A total of 10⁵ cells were transfected with TrkC constructs using JetPrime (PolyPlus), and grown in serum-poor medium. Cell death was analyzed 48 h posttransfection: Caspase-3 activity was measured as described (5) using the Ac-DEVD-AFC substrate assay (Biovision, K105-400), whereas total cell death index was measured using the ToxiLight assay from Lonza (LT07-117). The active caspase-3 was detected in immunostaining using an antibody specifically targeting the active form of caspase-3 and not the zymogen (Cell Signaling, #9661).

Protein Detection. HCT116 and HCT116 DKO were lysed in 50 mM Hepes (pH 7.6), 125 mM NaCl, 5 mM EDTA, and 0.1% Nonidet P-40 in the presence of proteases inhibitors. For Western blotting, we used anti-panTrk (Santa Cruz, sc-139), anti-actin (Chemicon, MAB1501R).

Immunostaining of patient biopsies sections or cell lines was performed with an anti-TrkC antibody (Santa Cruz, sc-117) after

citrate unmasking (pH 7.3, 98 °C for 35 min) and revealed with Novolink kit (Leica). Sections of patient biopsies were counterstained with a Mayer's Hematoxylin coloration.

DNA Isolation. DNA was isolated from 60 samples of normal and tumoral colorectal tissue from patient biopsies. All of the samples were cryogrounded in liquid nitrogen and incubated at 55 °C in DNA extraction buffer containing 0.1 µg/µL of proteinase K for 3 h. After complete digestion, proteinase K was inactivated and DNA precipitated with NaCl, washed with ethanol, and resuspended in water.

Bisulfite Conversion and Analysis of TrkC Promoter Methylation by Pyrosequencing. The methylation status of the promoter of TrkC was examined by pyrosequencing, a highly reliable and quantitative method for the analysis of DNA methylation at multiple CpG sites with built-in internal controls for completeness of bisulfite treatment. Bisulfite treatment was carried out as described (6). Briefly, genomic DNA (0.5–1 µg), from associated normal and tumoral colorectal cancer samples, was treated with EZ DNA methylation-Gold kit (Zymo Research), according to the manufactured protocol. The modified DNA (20–25 ng/µL) was stored at –20 °C until use. A set of primers was designed on an in silico modified DNA sequence, to amplified a GC rich region of the TrkC promoter. DNA amplification was carried out on bisulfite-treated DNA using specific primers and PCR conditions: TrkC Forward 5'-GATTTGGTGATTTTAGTATTATTTT-3' and Reverse 5'-AAAAAAAACCTCTACCTTTAAAAC-3'. Modified DNA was amplified in a total volume of 50 µL: 10 µL of PCR was analyzed on agarose gel, and the remaining 40 µL was used in pyrosequencing assay using sequencing primers: 5'-GTTTTTAGAGTTTT-3' and 5'-TACAAAATCCTTCAA-3'. Pyrosequencing reactions were set up using PyroGold Reagent kit (Biotage) according to the manufacturer's instructions. The methylation levels at the target CpGs were evaluated by converting the resulting programs to numerical values for peak heights and expressed either as the percentage of methylation of individual CpG sites or as the mean of all CpGs analyzed.

Chromatin Immuno-Precipitation (ChIP). Formaldehyde was added to control or treated HCT116 cells to a final concentration of 1%, and the cells were incubated at 37 °C for 10 min. The medium was removed, and the cells were washed in 1 mL of ice-cold PBS containing protease inhibitors (Complete, Roche). Cells were pelleted, resuspended in 0.5 mL of lysis buffer (1% SDS/10 mM EDTA/50 mM Tris-HCl, pH 8.1), and incubated on ice for 10 min. Lysates were sonicated with 30-s cycles using a bioruptor. Debris were removed from samples by centrifugation for 10 min at 15,000 × g at 4 °C. An aliquot of the chromatin preparation (30 µL) was set aside and designated as the Input Fraction. Supernatants were diluted 10-fold in dilution buffer (1% Triton X-100/2 mM EDTA/20 mM Tris-HCl, pH 8.1/150 mM NaCl), precleared with protein A Sepharose beads (sigma, previously blocked with salmon sperm DNA and BSA) for at least 2 h at 4 °C. Beads were pelleted by centrifugation, and supernatants were incubated overnight at 4 °C with 5 µg of total H3 (Abcam, ab1791), antiacetylated histone H4 (Millipore, 06–598), or anti-H3K27Me3 Millipore 07–449) antibodies. Protein A Sepharose (40 µL) was added for 2 h at 4 °C. Protein A complexes were centrifuged, washed three times with wash buffer (0.1% SDS/2 mM EDTA, pH 8/150 mM NaCl/20 mM Tris-HCl, pH 8.1/1% Triton X-100) and once with final wash buffer (0.1% SDS/2 mM EDTA, pH 8/500 mM NaCl/20 mM Tris-HCl pH 8.1/1% Triton X-100). Immune complexes were eluted with 450 µL of elution buffer (1% SDS/0.1 M NaHCO₃). Samples were treated with RNase A and proteinase K overnight at 65 °C and DNA was recovered by phenol/chloroform extraction and ethanol precipitation. DNA concentration was measured and adjusted using a nanodrop. TrkC promoter specific primers (forward: 5'-GTC-

TTCACACTCTGTCCCCG-3' and reverse: 5'-ATTTTTACCC-CCGTCGCCAT-3') were used to carry out Q-PCR on input and ChIP samples using Sybr green (Roche).

Soft Agar Assay. For bottom agar, 2 mL of 1.8% agarose were diluted with 2 mL of 2× DMEM (2× DMEM/20% FBS/0.2% geneticin/500 mg/mL fungizone). A 4-mL volume of bottom agar was plated in a 60-mm tissue culture dish and allowed to harden. Cells were trypsinized and resuspended at 10⁵ cells per mL in 2× DMEM. The top agar cell suspensions were composed of 1 mL of cell suspension in 2× DMEM and 1 mL of 0.9% agarose, and were overlaid on dishes containing bottom agar. The final plating concentration was 10⁵ cells per dish. Fourteen days later, clones were observed and counted.

Migration Assay. Scratch assay. Six-well plates were coated with 50 µg/mL poly-L-lysine by incubating the dishes overnight at 4 °C or for 2 h at 37 °C without rotation or shaking. The unbound extracellular matrix (ECM) substrate was removed and the coated dishes blocked with 3 mL of 2 mg/mL BSA for 1 h at 37 °C. Then, the dishes were washed once with PBS and refilled with 3–5 mL of media before plating the cells. HCT116 cells (2 × 10⁶ per well) were plated and transfected with the plasmid constructs. A scratch was realized with a pipet tip 24 h later. The cell migration was monitored for the following 96 h.

Transwell assay. Transwell migration assays were performed using 24-well transwell Boyden chambers (8 µm PET membrane, Falcon). HCT116 cells (5 × 10⁵) were added to the top well resuspended in 500 µL serum-free medium, and the lower well was filled with 800 µL of medium containing 20% FBS. Where applicable, NT-3 or Z-VAD was added to the top well, together with the cells. After 48-h incubation, cells remaining on the upper side of the filter were removed with cotton swabs, and the cells that had migrated to the bottom surface of the filter were counted in 10 different fields per condition. The experiment was repeated three times, and one representative experiment is shown.

Chicken Model for Colorectal Cancer Progression. HCT116 cells were transfected with plasmids 48 h after plating, treated or not with NT-3 (10 ng/mL) and harvested 24 h posttransfection. HCT 116 transfected cells (5 × 10⁶) were suspended in 25 µL complete medium and 25 µL of matrigel with or without NT-3 (10 ng/mL). These cells were seeded on 10-d-old (day 10) chick chorioallantoic membrane (CAM) previously locally injured with a cotton swab. On day 17, tumors were resected and the area was measured with AxioVision Release 4.6 software (Carl Zeiss).

TUNEL Labeling of Tumor Sections. To monitor apoptosis on primary tumors, they were fixed on 4% PFA, cryoprotected by overnight treatment with 30% sucrose, and embedded in Cryomount (Histolab). TUNEL staining was performed on tumor cryostat sections (Roche Applied Science Diagnostics), and nuclei were stained with Hoechst (Sigma-Aldrich).

MAPK Pathway Activation. Cells transfected with the different TrkC mutants were lysed on ice in the following buffer (50 mM Tris, pH 7.5/1 mM EDTA/1mM EGTA/0.5 mM Na₃VO₄/0.1% β-mercaptoethanol/1% Triton X-100/50 mM sodium fluoride/5 mM sodium pyrophosphate/10 mM β-glycerophosphate/0.1 mM PMSF). Proteins were then analyzed by Western blot using an anti-Erk antibody (Cell Signaling) and an anti-phospho Erk antibody (Cell Signaling).

Statistics. Data presented are representative of at least three independent experiments, data are mean ± SEM. Statistical significance of differences between means was assessed by a Mann-Whitney test for paired values. Categorical data were analyzed with the χ² test. All statistical tests were two-sided. *P* values of less than 0.05 were considered to be statistically significant.

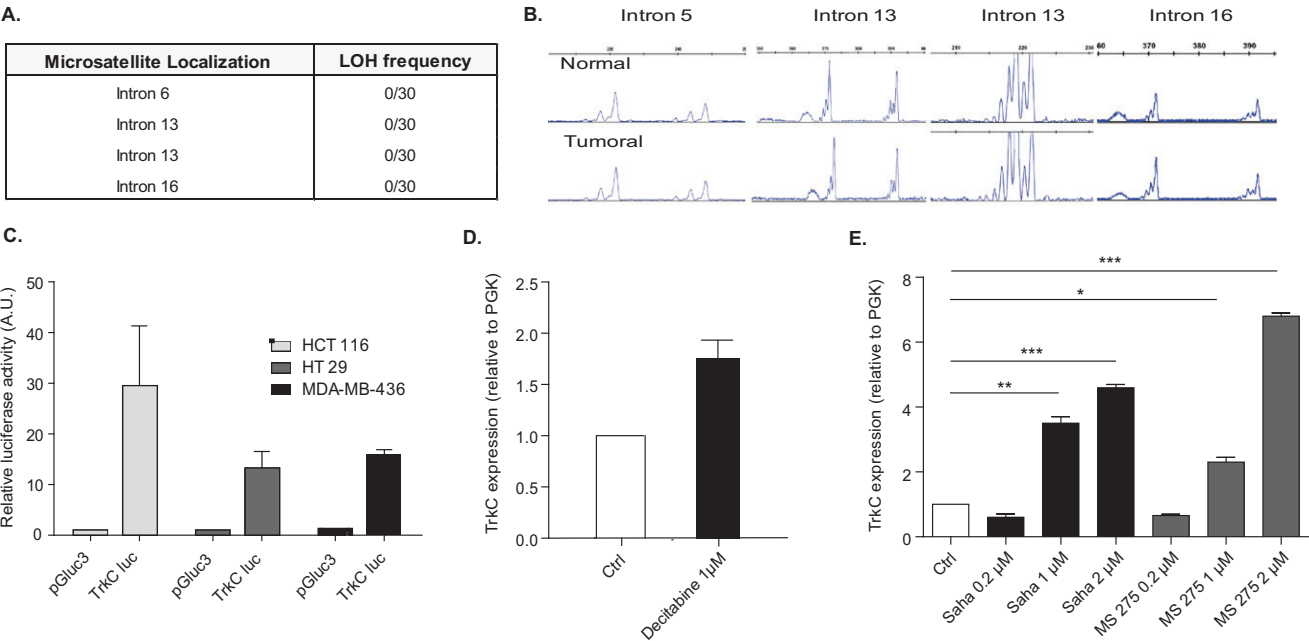
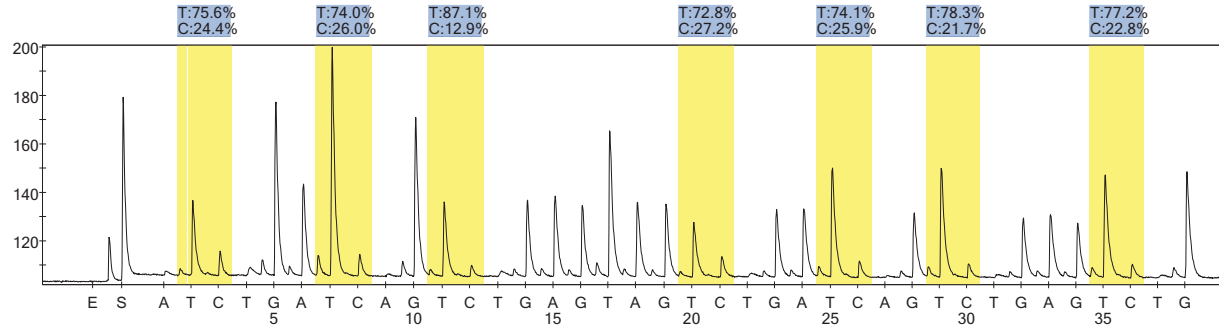


Fig. S2. Absence of LOH at the *TrkC* locus and *TrkC* re-expression in cancer cell lines. (A and B) LOH analyses were performed in a panel of 30 pairs tumors and matched normal tissues as described in *Experimental Procedures*. A representative pictogram of microsatellite sequence amplification is shown in B. (C) A construct encoding the luciferase reporter gene fused to *TrkC* promoter was transfected into HCT116 and HT29 colon cancer cell lines and as a control into breast cancer cells, MDA-MB-436. The corresponding empty vector pGluc3 was used as control. Luciferase activity was measured in the various cell lines. (D and E) HCT8 cells were treated for 72 h with decitabine (D) or for 24 h with Saha or MS 275 (E) at the indicated concentrations. *TrkC* expression was measured by Q-RT-PCR, using PGK as internal control. Data represent mean $\pm$ SEM * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001, two-sided Mann–Whitney test, compared with control.

Normal tissue



Tumoral tissue

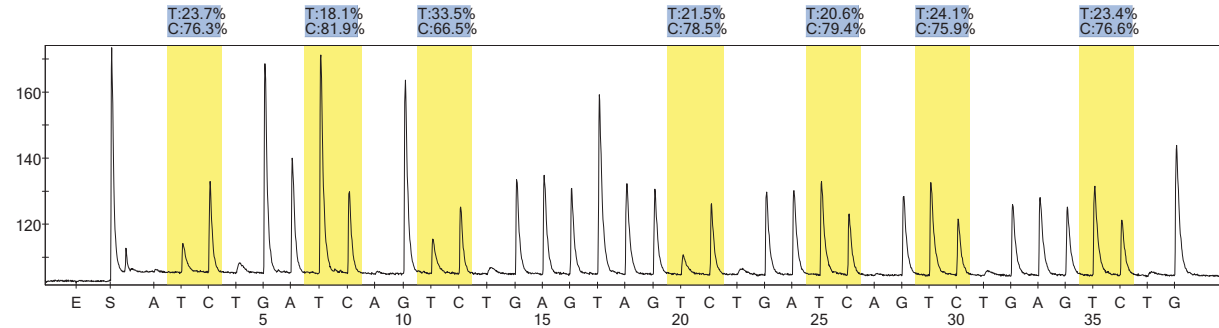


Fig. S3. Methylation of *TrkC* promoter. Representative pyrograms obtained for a pair of matched normal and tumoral samples. The sequence below the pyrograms indicates the sequentially added nucleotides. The yellow regions indicate the analyzed C/T sites; the proportion of C and T detected are provided as percentage values. This proportion corresponds to the ratio of methylated (C) and nonmethylated (T) DNA strands.

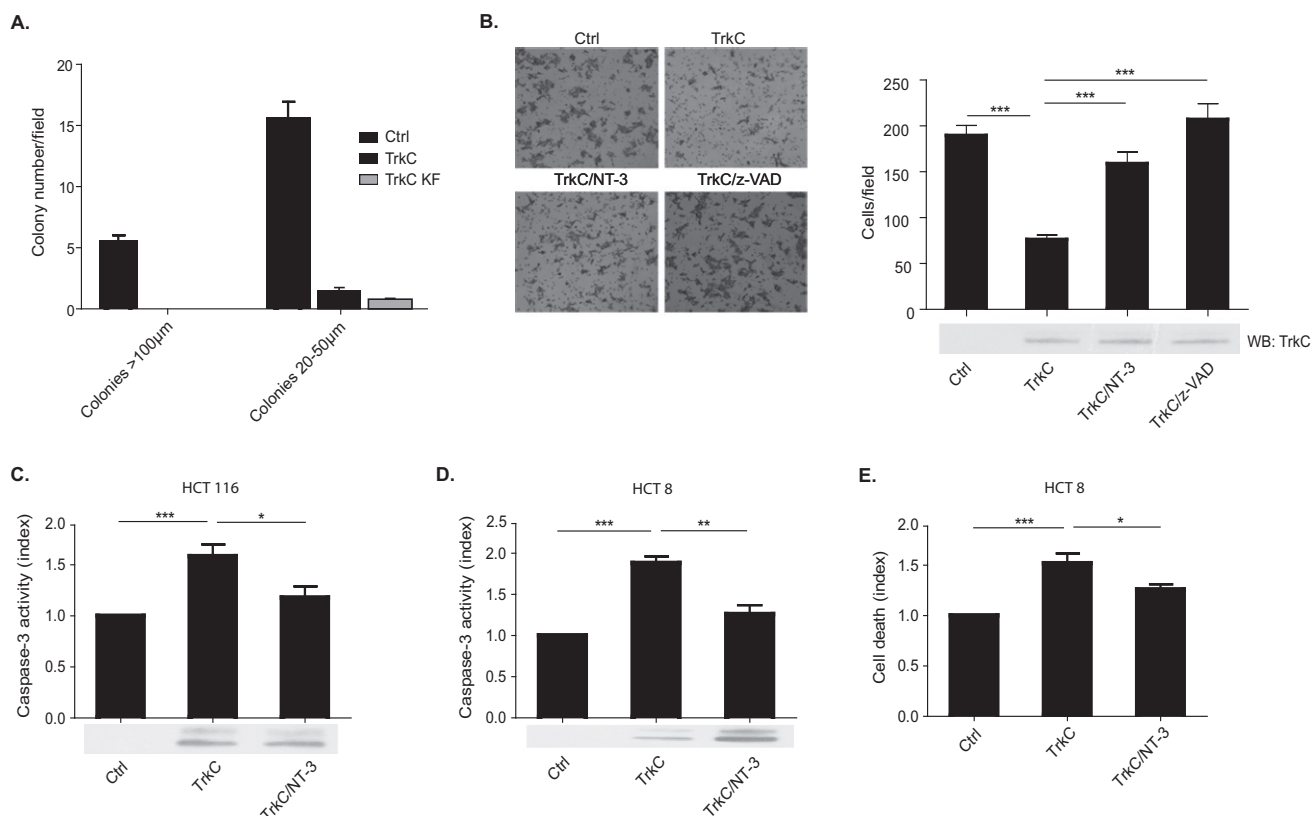


Fig. S4. TrkC limits anchorage-independent growth and migration and induces apoptosis. (A) Control, TrkC and TrkC KF overexpressing HCT116 cells were grown in soft agar for 2 wk. The number of colonies was counted in five random fields and the average number per field was calculated. Data represent mean $\pm$ SEM $^{*}P < 0.05$, $^{***}P < 0.001$, two-sided Mann–Whitney test, compared with control. The size of colonies for each condition is shown. (B) Transwell assay was performed on HCT116 cells expressing control vector and TrkC with or without NT-3 or Z-VAD-fmk addition. The migration was stopped at 48 h, and the migrated cells were counted (Right). Representative photographs are shown (Left). (C) TrkC induces cell death in HCT116 cells as shown by caspase-3 activity. (D and E) TrkC induces cell death in HCT8 cells as shown by caspase-3 activity (D) and Toxilight assay (E). Cell death is reversed by addition of NT-3 (10 ng/mL). Data represent mean $\pm$ SEM $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$, two-sided Mann–Whitney test.

2 – Article 2 : Le récepteur à dépendance TRKC déclenche l'apoptose par le recrutement de COBRA1 avant d'être transféré à la mitochondrie.

Dans cet article, nous décrivons le mécanisme pro-apoptotique par lequel TRKC induit la mort cellulaire. En conditions d'absence de son ligand, le domaine intra-cellulaire de TRKC est clivé par les caspases au niveau de deux résidus aspartiques, D495 et D641. Ce clivage, qui libère le fragment pro-apoptotique TRKC 496-642 (TRKC KF), est observé à la fois *in vitro* et *in vivo* dans des neurones primaires des DRGs (Tauszig-Delamasure et al., 2007). De plus, Cobra1, un partenaire identifié lors d'un crible double-hybride, interagit avec TRKC KF et agit comme un partenaire pro-apoptotique. Ainsi, quand *TrkC* et *Cobra1* sont co-exprimés, la mort cellulaire induite par TRKC est significativement augmentée. A l'inverse, une extinction de l'expression de *Cobra1* par ARN interférence bloque l'induction d'apoptose.

De manière intéressante, TRKC KF, en interagissant avec COBRA1, va partiellement se localiser à la mitochondrie, où il pourra activer BAX. Finalement, cette coopération va conduire au relargage du Cytochrome c, la formation de l'apoptosome, l'activation des caspases-9 et -3, et à l'apoptose elle-même.

Afin d'analyser la relevance *in vivo* du rôle de COBRA1 dans l'apoptose induite par TRKC privé de NT-3, nous avons utilisé le modèle du développement du tube neural et des DRGs (Dorsal Root Ganglia) chez l'embryon de poulet ; modèle dans lequel TRKC et NT-3 ont été décrits pour leur implication. Nous avons ainsi pu montrer que la suppression de *NT-3* dans le tube neural et les DRGs entraîne la mort cellulaire, et que cette mort cellulaire est bloquée quand COBRA1 est invalidé dans les embryons de poulet. Nous démontrons ainsi que COBRA1 est un effecteur essentiel de la mort neuronale observée en l'absence de NT-3.

En conclusion, nous présentons dans ces travaux des éléments démontrant que TRKC, en interagissant avec COBRA1, est le premier récepteur à dépendance induisant l'apoptose par l'activation de la voie mitochondriale intrinsèque.

The Dependence Receptor TrkC Triggers Mitochondria-Dependent Apoptosis upon Cobra-1 Recruitment

Gabriel Ichim,^{1,7} Anne-Laure Genevois,^{1,7} Marie Ménard,^{1,7} Li-Ying Yu,² Juliana M. Coelho-Aguiar,^{3,4} Fabien Llambi,⁵ Loraine Jarrosson-Wuilleme,¹ Jonathan Lefebvre,⁶ David Tulasne,⁶ Elisabeth Dupin,³ Nicole Le Douarin,³ Urmas Arumãe,² Servane Tauszig-Delamasure,^{1,8} and Patrick Mehlen^{1,8,*}

¹Apoptosis, Cancer and Development Laboratory, Equipe Labellisée La Ligue, LabEx DEVweCAN, Centre de Cancérologie de Lyon, INSERM U1052-CNRS UMR5286, Université de Lyon, Centre Léon Bérard, 69008 Lyon, France

²Institute of Biotechnology, University of Helsinki, 00100 Helsinki, Finland

³Département de Biologie du Développement, Institut de la Vision Centre de Recherche, INSERM UMR S968/CNRS UMR 7210, Université Pierre et Marie Curie, 75012 Paris, France

⁴Centro de Ciências da Saúde-ICB, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Avenida Carlos Chagas, 373 Ilha Do Fundão, 21941-902 Rio de Janeiro, Brazil

⁵Department of Immunology, St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, TN 38105, USA

⁶CNRS UMR 8161, Institut de Biologie de Lille-Institut Pasteur de Lille, Université de Lille 1-Université de Lille 2, Lille 59021, France

⁷These authors contributed equally to this work

⁸These authors contributed equally to this work and are co-senior authors

*Correspondence: patrick.mehlen@lyon.unicancer.fr

<http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2013.08.021>

SUMMARY

The neurotrophin receptor TrkC was recently identified as a dependence receptor, and, as such, it triggers apoptosis in the absence of its ligand, NT-3. The molecular mechanism for apoptotic engagement involves the double cleavage of the receptor's intracellular domain, leading to the formation of a proapoptotic “killer” fragment (TrkC KF). Here, we show that TrkC KF interacts with Cobra1, a putative cofactor of BRCA1, and that Cobra1 is required for TrkC-induced apoptosis. We also show that, in the developing chick neural tube, NT-3 silencing is associated with neuroepithelial cell death that is rescued by Cobra1 silencing. Cobra1 shuttles TrkC KF to the mitochondria, where it promotes Bax activation, cytochrome c release, and apoptosome-dependent apoptosis. Thus, we propose that, in the absence of NT-3, the proteolytic cleavage of TrkC leads to the release of a killer fragment that triggers mitochondria-dependent apoptosis via the recruitment of Cobra1.

INTRODUCTION

The neurotrophins NGF, BDNF, NT-3, and NT-4/5, and their respective receptors p75^{NTR}, TrkA, TrkB, and TrkC play a critical role in the developing peripheral nervous system. The neurotrophins are produced by the future targets of the sensory neurons and promote their migration, proliferation, and differentiation (Bibel and Barde, 2000). Importantly, the limited concentration

of each neurotrophin dictates the appropriate number of surviving neurons (Bibel and Barde, 2000). The neurotrophic theory is based on the idea that sensory neurons are naturally committed to dying unless a neurotrophic factor supports their survival. This programmed cell death has long been thought to result from the engagement of a “default” apoptotic cell program. However, recent studies have modified this view: TrkC and TrkA have been shown to trigger apoptosis when unbound by NT-3 and NGF, their respective ligands (Tauszig-Delamasure et al., 2007; Ichim et al., 2012; Nikolettou et al., 2010).

Therefore, TrkA and TrkC belong to the functional family of dependence receptors (DRs) (Rabizadeh et al., 1993; Mehlen et al., 1998; Bredesen et al., 2004). These receptors possess the ability to mediate trophic signaling in the presence of their respective ligands (e.g., proliferation, differentiation, and migration), but, unlike classical receptors, they mediate alternative signaling in the absence of ligand, triggering apoptosis (Mehlen and Bredesen, 2004; Goldschneider and Mehlen, 2010). This ligand-dependent dual signaling by DRs appears to play a crucial role in both embryonic development and tumorigenesis. Indeed, DRs are hypothesized to circumvent tumor progression and metastasis by eliminating aberrant cells that might otherwise proliferate in settings of limited concentrations of ligand (Mehlen et al., 1998; Goldschneider and Mehlen, 2010; Mehlen et al., 2011). In support of this hypothesis, it was recently demonstrated that the mechanism by which the dependence receptor DCC functions as a tumor suppressor requires its proapoptotic activity (Castets et al., 2012). With respect to the role of DRs during development, it has been proposed that this ligand-dependent inhibition of apoptosis is a mechanism for regulating developmental angiogenesis (Castets et al., 2009) and for fine tuning neuronal localization and migration during nervous system development (Furne et al., 2008; Mille et al., 2009; Thibert et al., 2003). The elegant work performed by Nikolettou et al.

et al. (2010) supports this view, demonstrating that the intrinsic proapoptotic activity of TrkA and TrkC is critical during nervous system development.

Despite the identification of over 20 DRs to date, relatively little is known regarding the signaling that underlies DR-mediated apoptosis upon ligand withdrawal. Most, but not all, DRs appear to require a preliminary proteolytic cleavage in their intracellular domains in order to allow interaction with proapoptotic partners. For example, upon cleavage, the dependence receptor Patched (Ptc) triggers apoptosis initiation after the recruitment of a caspase-activating complex (Mille et al., 2009); in contrast, UNC5B triggers apoptosis through the recruitment and activation of the serine threonine kinase DAPK (Guenebeaud et al., 2010; Liambi et al., 2005). However, it is not yet clear how tyrosine kinase dependence receptors trigger apoptosis upon proteolytic cleavage. We have previously shown that the unbound TrkC undergoes cleavage at two intracytoplasmic sites by caspase-like proteases, leading to the release of the TrkC 496–641 fragment (hereafter referred to as the “killer fragment” or KF), which is both necessary and sufficient for cell death induction. Although performing a search for putative partners of TrkC KF, we identified Cobra1 as a interactor for the TrkC KF. Cobra1 was initially identified as a BRCA1 cofactor, but little is known about its cellular role or localization (Sun et al., 2011; Yamaguchi et al., 1999; Ye et al., 2001). Here, we show that Cobra1 is localized in the cytosol and interacts with the TrkC KF. We also show that Cobra1 positively regulates TrkC-induced apoptosis. Moreover, Cobra1 silencing rescues dorsal root ganglion (DRG) neuronal apoptosis induced by NT-3 withdrawal in cell culture and prevents the apoptosis of DRG neuronal precursors resulting from NT-3 withdrawal in chick embryos. Finally, Cobra1 shuttles the TrkC KF to the mitochondria, where TrkC KF triggers cytochrome c release and apoptosome-dependent apoptosis. Altogether, our data support the view that TrkC utilizes the canonical mitochondrial pathway to induce apoptosis through Cobra1 recruitment.

RESULTS

Cobra1 Localizes to the Cytosol and Interacts with the Proapoptotic Fragment TrkC KF

We have previously shown that unliganded TrkC is cleaved by caspase at two sites within its intracellular domain, leading to the release of several intracellular fragments. This caspase-dependent cleavage can be detected both in vitro and in vivo (Tauszig-Delamasure et al., 2007). The cleavage of TrkC by caspase is required for apoptosis induction, given that the mutation of the caspase sites inhibits apoptosis induced by TrkC (TrkC DM in Figure 1A) (Tauszig-Delamasure et al., 2007). Furthermore, TrkC localization to an organized lipid microdomain at the membrane appears to be important for the dependence receptor activity of TrkC, given that treatment with cholesterol oxidase, which converts cholesterol to cholestenone and therefore disorganizes the composition of the lipid microdomain, decreases the ability of TrkC to trigger apoptosis in the absence of NT-3 (Figure S1A available online).

TrkC cleavage by caspases at two sites (D495 and D641) leads to the generation of three fragments: TrkC 1–495, TrkC 496–641,

and TrkC 642–825. In various cell lines, including the N2a neuronal cell line, the enforced expression of the internal caspase-generated fragment TrkC 496–641 was associated with the induction of cell death, whereas TrkC 1–495 and TrkC 642–825 displayed no proapoptotic activity (Figures 1A, 1B, and S1B–S1E) (Tauszig-Delamasure et al., 2007). Providing additional support for a model in which NT-3 withdrawal is associated with the cleavage of the intracellular domain of TrkC and the subsequent formation of the TrkC 496–641 proapoptotic fragment (TrkC KF), we found that, although NT-3 blocked TrkC-induced cell death (Figure S1F) (Tauszig-Delamasure et al., 2007), TrkC KF was proapoptotic whether NT-3 was absent or present (Figure 1B).

Given that the TrkC KF includes the kinase domain of TrkC, we assessed the tyrosine phosphorylation status of TrkC KF and its potential association with the induction of cell death. As shown in Figure S1G, although TrkC was tyrosine phosphorylated and its phosphorylation was enhanced by NT-3, the TrkC KF was not detected by an antibody against phosphotyrosine. Moreover, D572N, a TrkC kinase-dead mutation (McGregor et al., 1994) inserted into the TrkC KF (TrkC KF KD), triggered apoptosis to a similar extent as TrkC KF (Figure S1H). Thus, even though TrkC KF includes the TrkC kinase domain, this kinase domain is probably not active, and the phosphorylation of this domain is not implicated in the TrkC KF proapoptotic activity.

In a search for TrkC proapoptotic partners, we performed a yeast two-hybrid screen with the TrkC KF as bait and a mouse embryonic complementary DNA library as prey (Figure 1C). Of the putative interacting partners identified (which are presented in Figure 1C), we focused on Cobra1. Cobra1 (NELF-B, BRCA1 cofactor) was originally described as one of the four components of the negative elongation factor (NELF) shown in vitro to control RNA polymerase II (Pol II) pausing in transcription (Amleh et al., 2009). Cobra1 has been shown to be capable of shuttling to the cytoplasm (Yung et al., 2009). First, we confirmed the putative interaction observed in yeast by coimmunoprecipitation in human embryonic kidney (HEK) 293T cells transiently transfected with Cobra1 and TrkC or various TrkC cleavage fragments. Immunoprecipitations were performed by pulling down either TrkC fragments or Cobra1 (Figures 1D, S2A, and S2B). Although a TrkC mutant deleted after the first cleavage site at aa 495 (TrkC 1–495) failed to interact with Cobra1 (Figure S2B), Cobra1 interacted with full-length TrkC, TrkC KF, and TrkC 642–825 (Figures 1D and S2A). This interaction with TrkC was specific, given that the intracellular fragment of neogenin, an unrelated dependence receptor (Matsunaga et al., 2004), failed to interact with Cobra1 (Figure 1D). Thus, Cobra1 interacted not only with the proapoptotic TrkC KF but also with the remaining C-terminal TrkC fragment, TrkC 642–825, which is not proapoptotic (Figures S1B–S1E and S2C). Interestingly, this second interactive site with Cobra1 appeared to promote the Cobra1 recruitment to TrkC KF, given that TrkC 642–825 coexpression increased TrkC KF- and Cobra1-induced cell death (Figure S2C). TrkC KF bearing a kinase-dead mutation also interacted with Cobra1 (Figure S2D), providing additional support for the independence of the TrkC proapoptotic effect and TrkC tyrosine kinase activity. No specific structural domains have been described for Cobra1; however, immunoprecipitation assays of TrkC KF with deletions on both the C and N termini of Cobra1

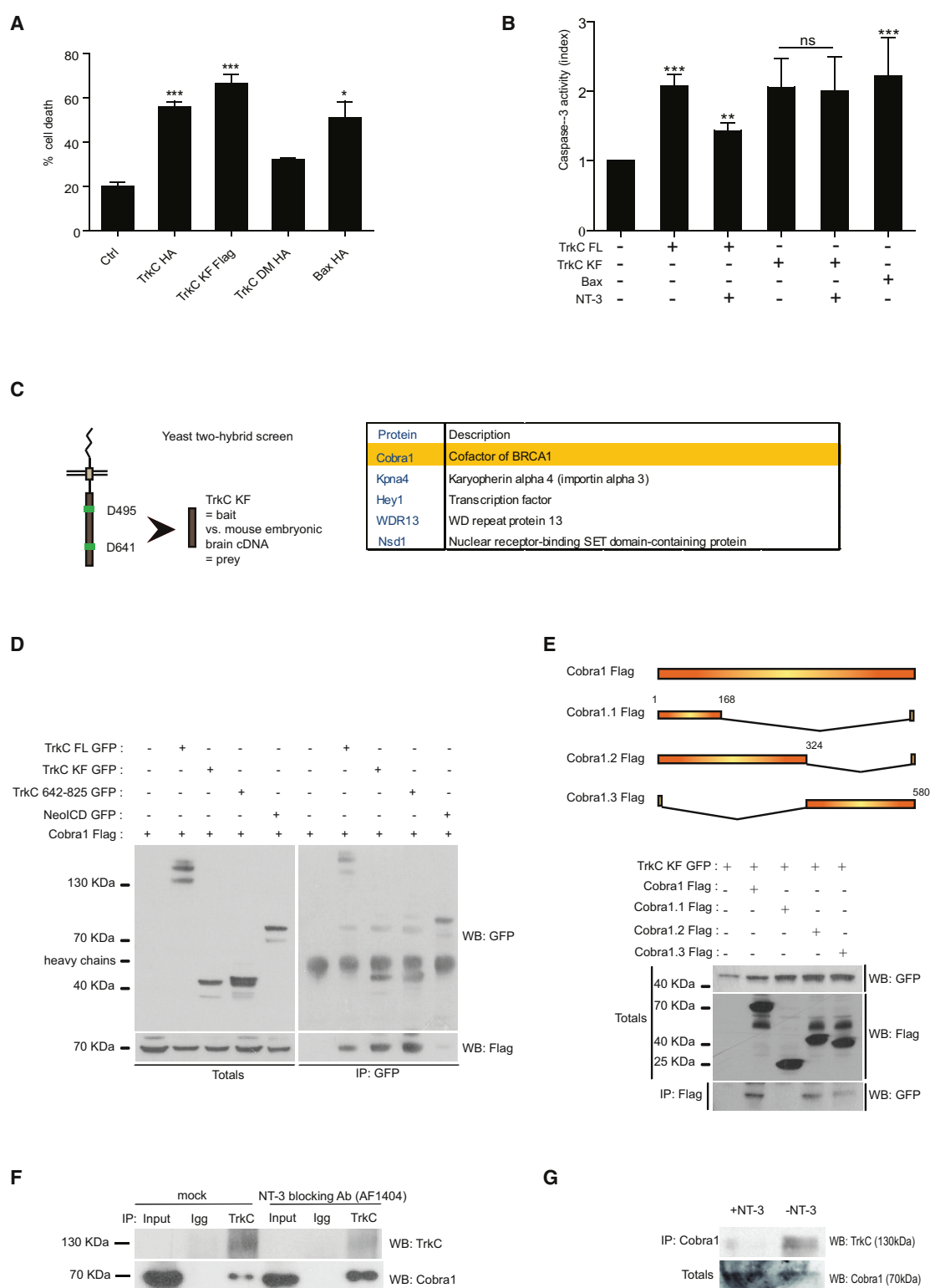


Figure 1. Identification of Cobra1 as a TrkC-Interacting Partner

(A and B) TrkC and TrkC 496–641 (TrkC KF) induce cell death in HEK 293T (A) and neuroblast N2A (B) cells, as shown by trypan blue exclusion and caspase-3 activity assay, respectively. Data represent mean $\pm$ SEM. * $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$ (two-sided Mann-Whitney test) in comparison to control.

(C) The yeast two-hybrid system used for screening for TrkC KF-interacting partners.

(legend continued on next page)

suggested that Cobra1 interacts with TrkC KF through its C-terminal region (aa 168–580) (Figure 1E). Indeed, although both Cobra1 (aa 1–324) and Cobra1 (aa 324–580) interacted with TrkC, Cobra1 (aa 1–168) did not (Figure 1E). Furthermore, the interaction between Cobra1 and the TrkC cleavage fragments was analyzed by confocal microscopy with COS-7 cells. In agreement with the coimmunoprecipitation data, a colocalization between Cobra1-RFP and TrkC KF-GFP was detected (Figure S2E). To explore whether this interaction could be seen with endogenous proteins in the nervous system, immunoprecipitation was performed on mouse brain tissue with the use of a TrkC antibody. Cobra1 was pulled down with the TrkC antibody (Figure 1F). In order to prevent the interaction of NT-3 with TrkC within the brain extract, we incubated adult mouse brain extracts with the AF1404 antibody, which blocks the NT-3-TrkC interaction (Bouzas-Rodríguez et al., 2010). Interestingly, the TrkC-Cobra1 interaction was increased by the addition of this NT-3-blocking antibody, which also triggers TrkC proapoptotic activity. To confirm that this interaction occurs within neurons, we cultured primary DRG neurons in the presence or absence of NT-3, and the interaction of TrkC with Cobra1 was investigated by immunoprecipitation. As shown in Figure 1G, a Cobra1-TrkC interaction was detected by immunoprecipitation, and this interaction was detected primarily in association with NT-3 deprivation. Altogether, these data support the notion that Cobra1 is an interacting partner of the dependence receptor TrkC.

Cobra1 Is Required for TrkC-Induced Apoptosis

In initial studies of the role of Cobra1 in TrkC proapoptotic activity, TrkC- and TrkC KF-induced cell death were analyzed after the overexpression of Cobra1. In A549 cells and N2A neuroblasts, although Cobra1 expression alone had no effect on cell death and both TrkC and TrkC KF expression triggered cell death, Cobra1 expression significantly increased both TrkC- and TrkC KF-induced cell death, as shown by caspase-3, trypan blue exclusion, and ToxiLight assays (Figures 2A, 2B, and S2F). In a loss-of-function experiment, Cobra1 was silenced by small interfering RNA (siRNA); the efficiency of the siRNA is shown in Figures S2G–S2I). As shown in Figure 2C, the silencing of Cobra1 abrogated TrkC KF-induced apoptosis, as measured by caspase activity. Interestingly, Cobra1-induced cell death was specific: indeed, the silencing of Cobra1 had no effect on death induced by another dependence receptor, Ptc (Figure 2C).

We have previously shown that DRG primary neurons undergo TrkC-induced apoptosis upon NT-3 withdrawal (Tauszig-Delamasure et al., 2007). We took advantage of this *ex vivo* model in order to test the involvement of Cobra1 in TrkC-induced cell death. DRGs were dissociated, and the sensory neurons were

cultured for five days in the presence of NT-3 (Figure 2D) or, as a control, in the presence of NGF. The withdrawal of NT-3 (or NGF) for 3 days lead to a significant increase in neuronal cell death. In a previous study, we showed that the microinjection of a dominant-negative mutant of TrkC (Tauszig-Delamasure et al., 2007) rescues neurons deprived of NT-3 specifically and not those dependent on NGF. Interestingly, when a Cobra1 siRNA was microinjected instead of the TrkC dominant-negative mutant in neurons, a similar rescue was observed (Figure 2E), although this siRNA had no effect on the apoptosis of NGF-deprived neurons (Figure 2F). Similar results were obtained when the neurons were deprived of NT-3 for 7 days (Figure 2G). Altogether, our data demonstrate that Cobra1 is a key player in TrkC-induced apoptosis in neuronal cell culture.

Furthermore, to analyze the *in vivo* relevance of Cobra1 in neuronal death observed upon NT-3 withdrawal, we utilized the model of the developing neural tube of the chick embryo. The neural crest cells (NCCs), which give rise to DRG precursors, are neuroepithelial cells located in the dorsal part of the neural tube. When they delaminate from the neural tube (embryonic day [E] 10–E13 in the mouse) (Lawson and Biscoe, 1979), Hamburger-Hamilton stage (HH) 13 to HH22 (i.e., E2–E3) in the chicken (Teillet et al., 1987), the NCCs express TrkC and require NT-3 for their survival and migration toward the DRG anlage (Bernd and Li, 1999; Fariñas et al., 1996; Pinco et al., 1993). Therefore, we investigated the effect of NT-3 silencing in the developing neural tube of chick embryos. HH12–HH15 (E2) chick embryos were electroporated *in ovo* with siRNA NT-3 or siRNA scramble along with GFP unilaterally in the neural tube and dissected 24 hr after electroporation (Figures 3A and S3A). The NT-3 siRNA was shown to silence chick NT-3 efficiently in cell culture (Figure S3B) as well as in the dissected neural tube (Figure 3B). As shown in Figure 3C, GFP-positive cells correspond to neuroepithelial cells located in the dorsal half of the neural tube that will delaminate. Then, NCCs navigate through the mesenchyme dorsoventrally between the neural tube and the dermatome in order to reach the DRG anlage and form the DRG. Representative sections are shown in Figure 3C. Apoptosis was observed in the neural tube of NT-3-silenced embryos, as assessed by TUNEL and active caspase-3 labeling. TUNEL-positive cells were counted in the neural tube and in the mesenchymal DRG anlage, and we observed a significant increase of dead precursors in the NT-3 knockdown embryos (siRNA NT-3) in comparison to the control embryos (siRNA scr) (Figure 3D). However, this cell death was prevented by the knockdown of Cobra1 (pshCobra1) (Figures 3E, 3F, and S3C). These data support the view that, *in vivo*, Cobra1 is a main effector of neuronal death observed upon NT-3 reduction.

(D) Immunoprecipitation of TrkC GFP, TrkC KF GFP, TrkC 642–825 GFP, and Neogenin ICD GFP in HEK 293T transfected cells. All proteins were immunoprecipitated with anti-GFP, and Cobra1 was revealed by an anti-FLAG western blot.

(E) A graphical representation of the Cobra1 deletion constructs (the corresponding amino acids are indicated) and immunoprecipitation of Cobra1.1, Cobra1.2, and Cobra1.3 with anti-FLAG; the interaction with TrkC KF was revealed by an anti-GFP western blot.

(F) Immunoprecipitation of TrkC in adult mouse brain lysate incubated (or not) with AF1404, an NT-3-blocking antibody that induces TrkC proapoptotic activity. Cobra1 was revealed by western blot with an antibody against Cobra1.

(G) E14 DRG neurons were cultured with NT-3 for 5 days, deprived of trophic factor for 12 hr, and immunoprecipitated with anti-Cobra1. TrkC was revealed by western blot.

See also Figure S1.

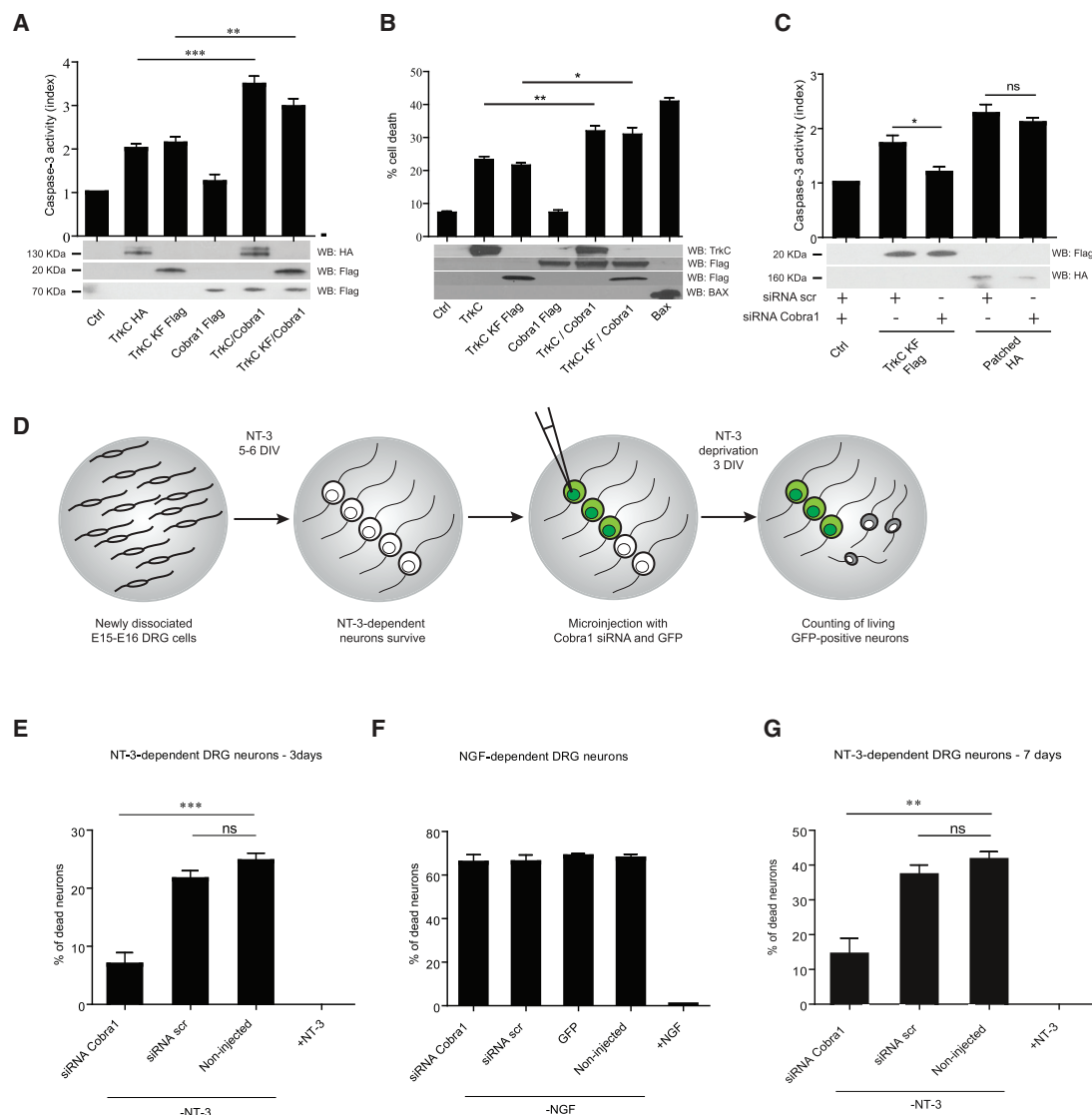


Figure 2. Cobra1 Enhances TrkC-Induced Apoptosis both In Vitro and In Vivo

(A and B) Coexpression of Cobra1 enhances cell death induced by both TrkC and TrkC KF, as shown by caspase-3 activity assay in A549 cells (A) and Trypan blue exclusion assay in N2A cells (B).

(C) Cobra1 silencing rescues the cell death induced by TrkC KF in A549 cells, as measured by the caspase-3 assay. Data represent mean $\pm$ SEM. * p < 0.05 and *** p < 0.001 (two-sided Mann-Whitney test) in comparison to control.

(D) The experimental model used for the neurotrophic assay on the microinjected DRG sensory neurons. DIV, days in vitro.

(E, F, and G) Sensory neurons were maintained with either NT-3 or NGF and microinjected with the plasmids for scrambled or Cobra1 shRNA, and cell death was induced by unliganded TrkC or TrkA was quantified 3 and 7 days later. Data represent mean $\pm$ SEM (n = 4). *** p < 0.001 (ns, nonsignificant; two-sided Mann-Whitney test) in comparison to control.

See also Figure S2.

TrkC KF Shuttles to the Mitochondria and Induces Cytochrome c Release

In addition to the observation that a large pool of Cobra1 is cytoplasmic, we observed a punctiform staining suggestive of mitochondrial localization. As shown in Figure 4A, Cobra1 displayed a Pearson's coefficient of 0.5 with the MitoTracker, which was supportive of a pool of Cobra1 with a mitochondrial localization. To explore whether this localization could be observed with

endogenous Cobra1 in the nervous system, we performed a subcellular fractionation followed by Cobra1 western blot analysis from the mouse semidissociated nervous system treated either with NT-3 or the TrkC-blocking antibody AF1404. As shown in Figure 4B, Cobra1 was detected in the mitochondria-enriched fraction, but this presence was markedly increased when the NT-3-TrkC interaction was disrupted (i.e., when TrkC was in a proapoptotic setting).

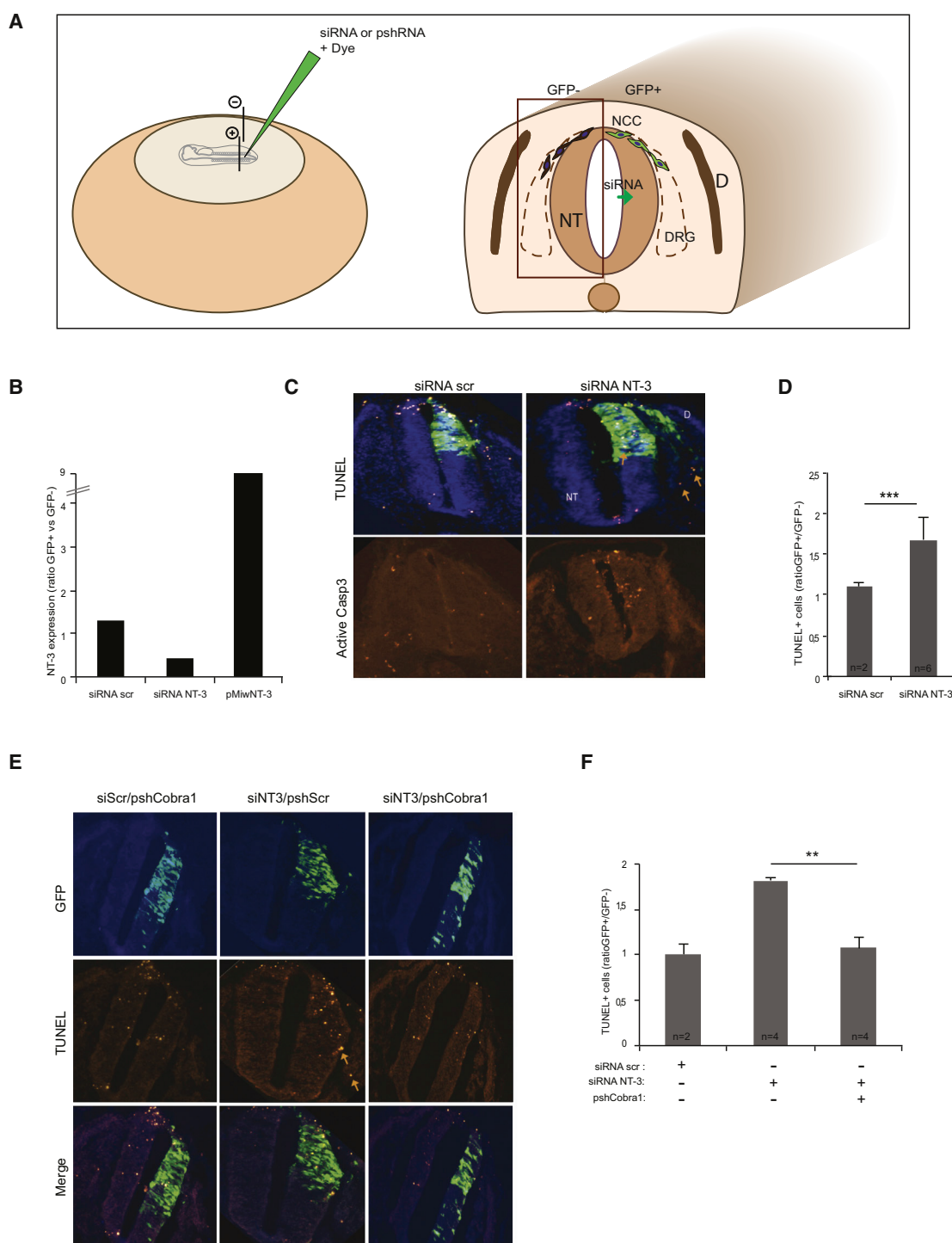


Figure 3. Unbound TrkC Induces Neuroepithelial Cell Death in the Chick Embryo via Cobra1

(A) An experimental model of chick embryo electroporation. Left, HH12–HH15 chick embryos are electroporated in ovo after injection in the neural tube of a mixed solution of siRNA or pshRNA with a dye. Right, a schematic section of a neural tube 24 hr after unilateral electroporation. GFP-positive (electroporated side) or GFP-negative (nonelectroporated side) NCCs migrate out of the neural tube to colonize the DRG anlage (dotted line) between the neural tube (NT) and the dermatome (D). The areas of TUNEL-positive cells counting on the electroporated side (GFP+) and on the nonelectroporated side (GFP–) are indicated by the green and brown rectangles, respectively.

(B) Measure by qRT-PCR of chick NT-3 expression in the dissected electroporated neural tube (GFP+) versus its nonelectroporated (GFP–) part after the electroporation of a control siRNA, an siRNA targeting chick NT-3, or a plasmid expressing chick NT-3 as a positive control.

(legend continued on next page)

Because Cobra1 is required for TrkC KF-induced apoptosis and because a fraction of Cobra1 appears to be localized to the mitochondria, we investigated whether TrkC KF induces apoptosis through the canonical mitochondria-dependent pathway. As a first approach, we analyzed the ability of TrkC KF to trigger cell death in murine embryonic fibroblasts (MEFs), cells deficient in caspase-9, Apaf1, or Bak and Bax. As shown in [Figures 4C, 4D, S4A, and S4B](#), TrkC triggered apoptosis in wild-type MEFs, whereas the MEFs lacking Bax and Bak, caspase-9, or Apaf1 were insensitive to TrkC expression. To further discriminate the respective implication of Bax versus Bak, we silenced either Bax or Bak by siRNA in A549 cells. Although Bax silencing efficiently blocked TrkC KF-induced cell death, Bak silencing had no effect ([Figures 4E, 4F, S4C, and S4D](#)), supporting the view that Bax, but not Bak, is required for TrkC-induced apoptosis. Moreover, we observed that the ectopic expression of TrkC KF induces Bax activation, as shown by anti-active Bax immunofluorescence ([Figures 4G and S4E](#)).

Given that several proteins, such as HER2 ([Strohecker et al., 2008](#)), p53 ([Sayan et al., 2006](#)), the hepatitis C virus core protein ([Mohd-Ismail et al., 2009](#)), and Bid ([Li et al., 1998](#)), have been shown to be caspase substrates, releasing cleavage fragments that localize to the mitochondria and trigger apoptosis, we investigated whether the proapoptotic TrkC KF also colocalized with mitochondria. GFP-tagged TrkC, TrkC KF, TrkC 495–825, or Bax were transiently expressed in COS-7 cells in which the mitochondria were labeled with MitoTracker. As shown in [Figure 5A](#) and determined from the Pearson's coefficient ([Figure 5B](#)), although full-length TrkC and TrkC 495–825 showed no colocalization with the mitochondria, the proapoptotic TrkC KF displayed a partial overlapping with MitoTracker. Similar results were obtained with the use of a TrkC KF FLAG construct ([Figure S4F](#)). Furthermore, these observations were supported by subcellular fractionation and western blot analysis of TrkC in neuronal cells. As shown in [Figure 5C](#), in N2A cells, TrkC KF and Bax were both detected in cytosolic and mitochondrial fractions, and mitochondrial localization of TrkC KF was not dependent on actin ([Figure S4G](#)). Thus, a pool of TrkC KF displayed a mitochondrial localization.

To assay whether TrkC KF and Cobra1 were integrated into the mitochondrial membrane, mitochondria from HEK293T cells that ectopically express TrkC KF and Cobra1 were sonicated, allowing the separation of mitochondrial membrane-associated (MMAP) and soluble (MSP) proteins. As shown in [Figure 5D](#), TrkC KF was found exclusively associated with the mitochondrial membranes, while Cobra1 resided in both compartments. In a first attempt to determine whether, similarly to tBID ([Li et al., 1998](#)), TrkC KF acts directly at the mitochondria level to trigger apoptosis, TrkC KF was expressed in COS-7 cells and

cytochrome *c* localization was monitored by immunofluorescence. Confocal analysis showed that cytochrome *c* displayed a typical mitochondrial localization in COS-7 cells expressing TrkC 495–825 or TrkC 642–825 ([Figure 6A](#)). In contrast, COS-7 cells expressing TrkC KF, similarly to cells expressing Bax, showed diffuse cytochrome *c* staining, consistent with induction of mitochondrial outer membrane permeabilization (MOMP) ([Figure 6AB](#)). In addition, the analysis of cytosolic cytochrome *c* by immunoblot showed that TrkC KF expression was associated with cytochrome *c* release in transfected A549 cells ([Figure 6C](#)). Using HeLa cells stably expressing Omi-mCherry ([Tait et al., 2010](#)), we also observed that TrkC KF, similarly to Bax, triggered the mitochondrial release of Omi ([Figure S4H](#)). Altogether, our results indicate that TrkC KF partially translocates to the mitochondria and triggers cytochrome *c* release.

Cobra1 Regulates the Mitochondrial Localization of TrkC KF

Because Cobra1 was shown to be involved in TrkC KF-induced cell death and because Cobra1 was localized to the mitochondria, we investigated the functional role of Cobra1 in the mitochondrial localization of the proapoptotic TrkC KF. As an initial approach, we coexpressed Cobra1 along with TrkC KF in HEK 293T cells and monitored the mitochondrial localization of TrkC KF. As shown in [Figures 7A and 7B](#), Cobra1 clearly increased the TrkC KF mitochondrial localization. This finding was in line with the fact that Cobra1 enhances TrkC-induced apoptosis. Then, we performed a loss-of-function experiment by silencing Cobra1 in HEK 293T cells via a small hairpin RNA (shRNA) approach ([Figure 7C](#)). The silencing of Cobra1 in HEK 293T cells prevented the accumulation of the proapoptotic TrkC KF at the mitochondria ([Figures 7D and 7E](#)). This finding was confirmed in COS-7 cells, in which TrkC KF showed a lower colocalization coefficient with the mitochondria after Cobra1 silencing ([Figure 7F](#)). As a control, Bax localization was evaluated and found not to be affected by Cobra1 silencing. These data support the view that Cobra1 is required for the mitochondrial translocation of TrkC KF and the subsequent induction of MOMP and the intrinsic apoptosis pathway ([Figure 7G](#)).

DISCUSSION

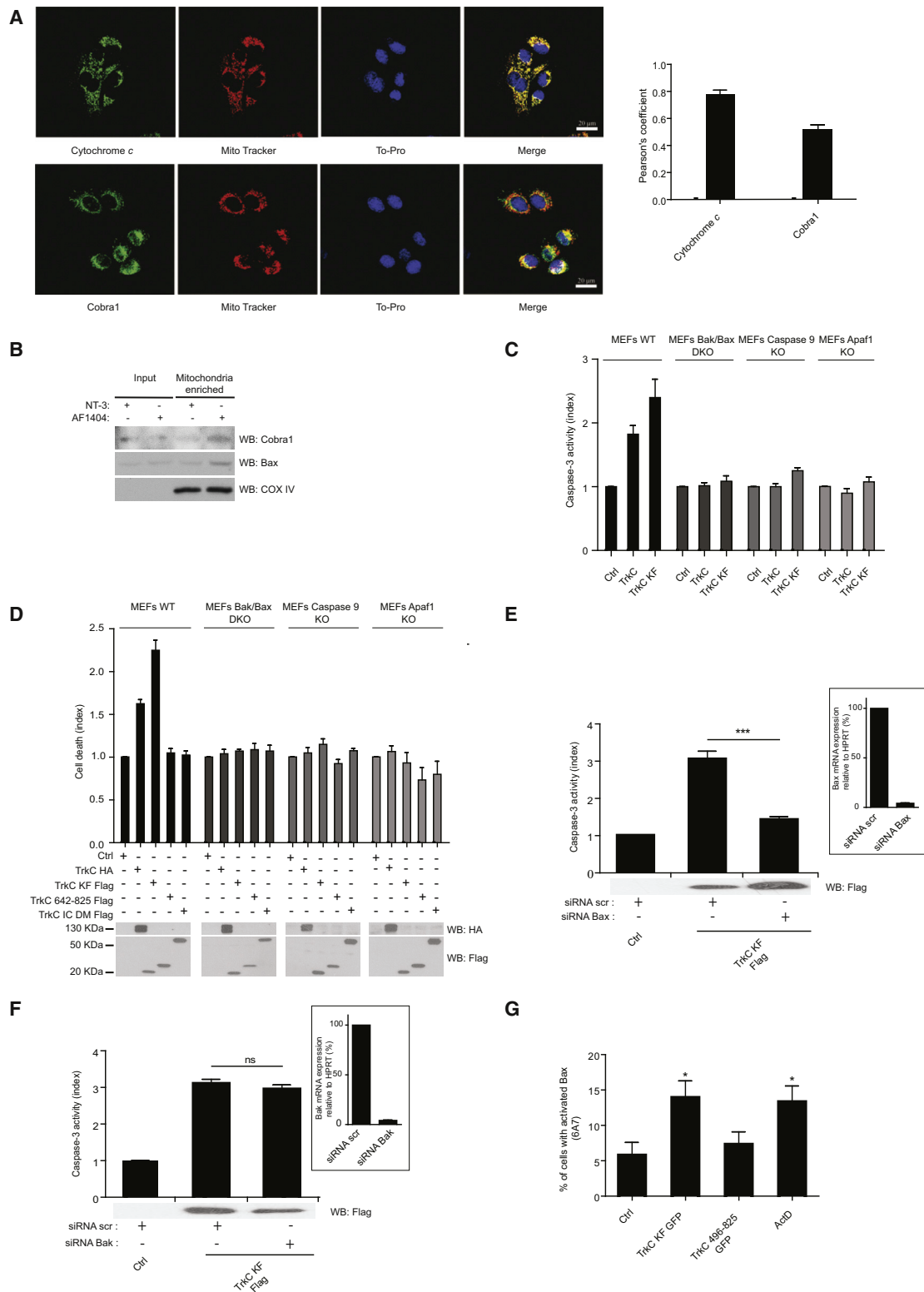
The emergence of the dependence receptor paradigm has provided unexpected insight into the mechanisms underlying apoptosis during nervous system development and in the control of tumor progression. These receptors have been proposed to play a crucial role in the control of neuronal colonization ([Furne et al., 2008](#); [Matsunaga et al., 2004](#); [Tang et al., 2008](#); [Thibert et al., 2003](#)). They have also emerged as negative regulators of

(C) Chick embryo sections electroporated with 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ siRNA and stained with either TUNEL staining or active caspase-3 antibody. Representative TUNEL-positive cells are indicated by arrows. D, dermatome; NT, neural tube.

(D) Quantification of the experiment described in (C): serial sections of two to six embryos per conditions were stained with TUNEL, and TUNEL-positive cells were counted on both the electroporated (GFP+) and the nonelectroporated (GFP-) sides. The ratio of these two measures is calculated to avoid stage or size differences from one embryo to the other. Data represent mean $\pm$ SEM. *** $p < 0.001$ (two-sided Mann-Whitney test) in comparison to control.

(E) Chick embryo sections electroporated with 2.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ siRNA (control or targeting NT-3) and 2.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ pshscramble (pshScr) or pshCobra1 labeled with TUNEL. (F) Quantification of (E) with the same method as in (D). Data represent mean $\pm$ SEM. ** $p < 0.01$ (two-sided Mann-Whitney test) in comparison to control.

See also [Figure S3](#).



(legend on next page)

tumor progression, and dependence-receptor-mediated death pathways do indeed appear to be switched off in aggressive tumors. One way to silence this death pathway is by upregulating the receptors' ligands (Delloye-Bourgeois et al., 2009a; Delloye-Bourgeois et al., 2009b; Mehlen et al., 2011; Mehlen and Puisieux, 2006). In this regard, we observed that aggressive neuroblastoma tumors produce NT-3 in an autocrine fashion, a selective advantage that allows them to proliferate and/or metastasize in settings of ligand limitation (Bouzas-Rodriguez et al., 2010). Therefore, interfering with ligand-DR interaction could represent an alternative targeted therapy against cancer, as supported by the fact that we were able to inhibit tumor growth and metastasis by interfering with TrkC-NT-3 interaction in various preclinical models (Bouzas-Rodriguez et al., 2010).

However, even though their role in development and cancer is now better appreciated, the molecular mechanisms by which these receptors engage the apoptotic process remain largely unclear. Recent studies have begun to decipher the mechanisms induced by some dependence receptors in the absence of their trophic ligands. In the absence of its ligand, the dependence receptor Ptc was shown to recruit a complex formed by DRAL and TUCAN, a CARD-domain-containing protein that ultimately activates caspase-9 (Mille et al., 2009). In contrast, the dependence receptor UNC5H2 requires DAP kinase and its subsequent dephosphorylation by PP2A in order to induce apoptosis (Guenebeaud et al., 2010; Llambi et al., 2005). However, because DRs do not usually show any structural similarity, the cell death mechanisms downstream of the receptor may turn out to be different for each DR. Here, we describe that, for TrkC, it implies the recruitment of Cobra1 by the proapoptotic fragment resulting from TrkC cleavage. Cobra1 was initially described in NELF, a nuclear complex that has four components, of which Cobra1 represents NELF-B (Yamaguchi et al., 1999). This complex has been shown to negatively regulate transcription elongation mediated by RNA Pol II (Sun et al., 2011; Yamaguchi et al., 1999) and, along with BRCA1, is also involved in chromatin dynamics (Ye et al., 2001). Although most of the data reported above are centered on a nuclear function of Cobra1, it is worth noting that there are several studies indicating that Cobra1 may have a cytoplasmic localization and, thus, function. Here, we report that Cobra1 partially localizes to the mitochondria and, more importantly,

that it is intrinsically linked to the shuttling of TrkC KF to the mitochondria.

Interestingly, the fact that Cobra1 and TrkC KF trigger mitochondria-dependent apoptosis supports the view that some DRs may use this intrinsic pathway of apoptosis. Although we previously reported that the DR DCC induces apoptosis independently of the intrinsic pathway (Forcet et al., 2001), this may not be a general trait of DRs. Here, we show that TrkC-induced apoptosis requires key mediators of the intrinsic pathway, such as Bax, Apaf1, and caspase-9, and that TrkC KF efficiently triggers cytochrome c release (see the model depicted in Figure 7G).

Interestingly, other caspase substrates have also been shown to generate proapoptotic mitochondrial-targeted fragments, such as the tyrosine kinase receptor HER2, which, upon caspase cleavage, releases two Bad-like fragments that localize to the mitochondria and induce cytochrome c release (Strohecker et al., 2008). Similar results have been obtained for HER4 (Naresh et al., 2006), p53 (Sayan et al., 2006), and the hepatitis c virus core protein (Mohd-Ismail et al., 2009). Preliminary data suggest that TrkC KF does not bind antiapoptotic BCL-2 family proteins and, therefore, is not likely to induce apoptosis by inhibiting them (data not shown). However, sequence analysis suggests the presence of a BH3-like domain in TrkC KF. Nonetheless, we failed to detect any biological effect by extensive mutation of this BH3-like domain (data not shown).

One alternative could be that TrkC KF behaves as a direct activator (Llambi and Green, 2011) by activating Bax and triggering its oligomerization and subsequent mitochondrial outer membrane permeabilization. This view is supported by the fact that TrkC KF induces cell death in a strictly Bax-dependent manner and that the overexpression of TrkC KF triggers Bax activation.

The cleavage of TrkC is the initiating step in the engagement of this cell-death program. Interestingly, both TrkC and TrkA were shown to be dependence receptors and to trigger apoptosis actively in the absence of their respective ligands (Ichim et al., 2012; Nikolettou et al., 2010; Tauszig-Delamasure et al., 2007). However, although it appears that TrkC is cleaved by caspases in its intracellular domain, TrkA is not (Ichim et al., 2012; Nikolettou et al., 2010). This observation suggests that, although TrkC cleavage is required in order to release the TrkC KF, TrkA probably triggers cell death by another mechanism.

Figure 4. TrkC KF-Induced Apoptosis Involves the Mitochondrial Pathway

(A) Endogenous Cobra1 partially localizes at the mitochondria, as shown by confocal analysis in A549 cells (left) and by the associated Pearson's coefficient (right). Data represent mean $\pm$ SEM.

(B) Cobra1 is enriched in the mitochondrial fraction in brain extract upon the inhibition of NT-3-TrkC interaction. Semidissociated adult mouse brains were incubated for 6 hr with NT-3 (100 ng) and NT-3-blocking antibody, and AF1404 (200 μ g) and the brain extracts were fractionated before immunoblotting for Cobra1, Bax, and COX IV. "Input" corresponds to the protein lysate before mitochondrial enrichment.

(C and D) Ectopic expression of TrkC and TrkC KF induces apoptosis in wild-type MEFs, whereas it has no effect on MEFs invalidated for Bax and Bak, caspase-9, and Apaf1. In brief, MEF cells were transiently transfected with the indicated construct, and cell death was measured after 24 hr in low-serum medium with either caspase activity assay (C) or ToxiLight (D). Data represent mean $\pm$ SEM.

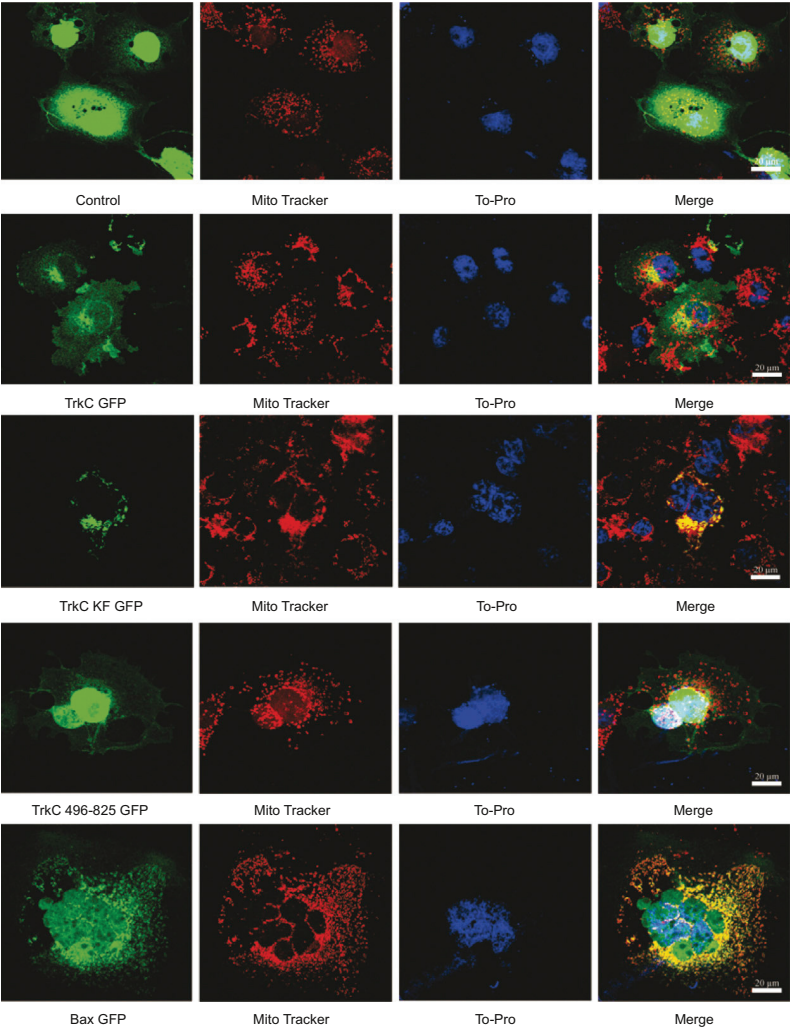
(E) The invalidation of Bax in A549 cells prevents TrkC KF-induced cell death. The efficacy of the siRNA Bax was measured by qRT-PCR on endogenous Bax in A549 cells (box).

(F) Experiments performed as in (E) with siRNA for Bak. The efficacy of siRNA Bak was measured by qRT-PCR on endogenous Bak in A549 cells (box). Data represent mean $\pm$ SEM. *** p < 0.001 (ns, nonsignificant; two-sided Mann-Whitney test) in comparison to control.

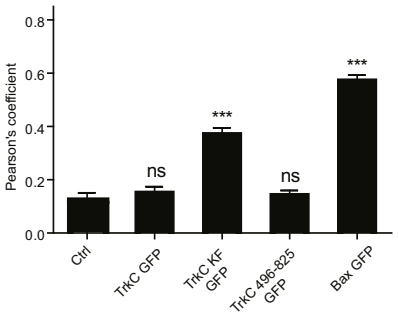
(G) Similar to actinomycin D, TrkC KF is able to activate Bax, as shown on Cos7 cells immunostained with the Bax 6A7 (active Bax) antibody. Data represent mean $\pm$ SEM. * p < 0.1 (two-sided Mann-Whitney test) in comparison to control.

See also Figure S4.

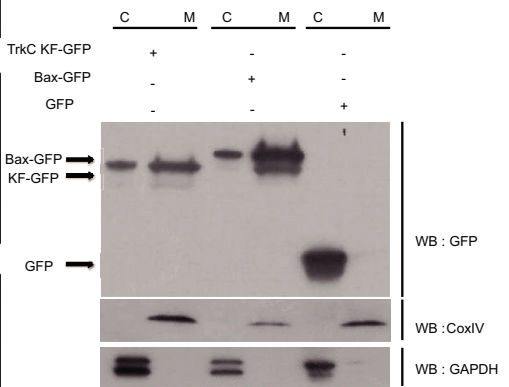
A



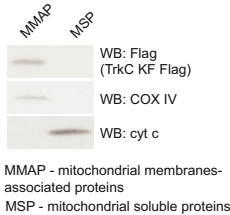
B



C



D



E

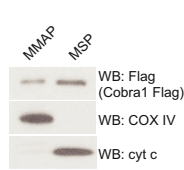


Figure 5. TrkC KF Partially Localizes at the Mitochondria

(A) Confocal analysis of COS-7 cells revealing a partial colocalization of TrkC KF GFP with the mitochondria, stained by Mito Tracker Red CMXRos. Cells were treated with z-VAD in order to avoid apoptosis amplification and cell destruction.

(B) Pearson's coefficient analysis of the colocalization of TrkC GFP, TrkC KF GFP, TrkC 496-825, and Bax GFP with the mitochondria. Data represent mean $\pm$ SEM. *** $p < 0.001$ (ns, nonsignificant; two-sided Mann-Whitney test) in comparison to control.

(C) N2A cells were transfected with TrkC KF GFP, Bax GFP, or GFP alone and fractionated into cytosolic (C, marker: GAPDH) and mitochondrial fractions (M, marker: COX IV). Arrows indicate the molecular weights of the different constructs.

(D and E) Mitochondria were isolated from HEK 293T cells expressing TrkC KF FLAG and Cobra1 FLAG and fractionated into membrane-associated (MMAP) and -soluble proteins (MSP).

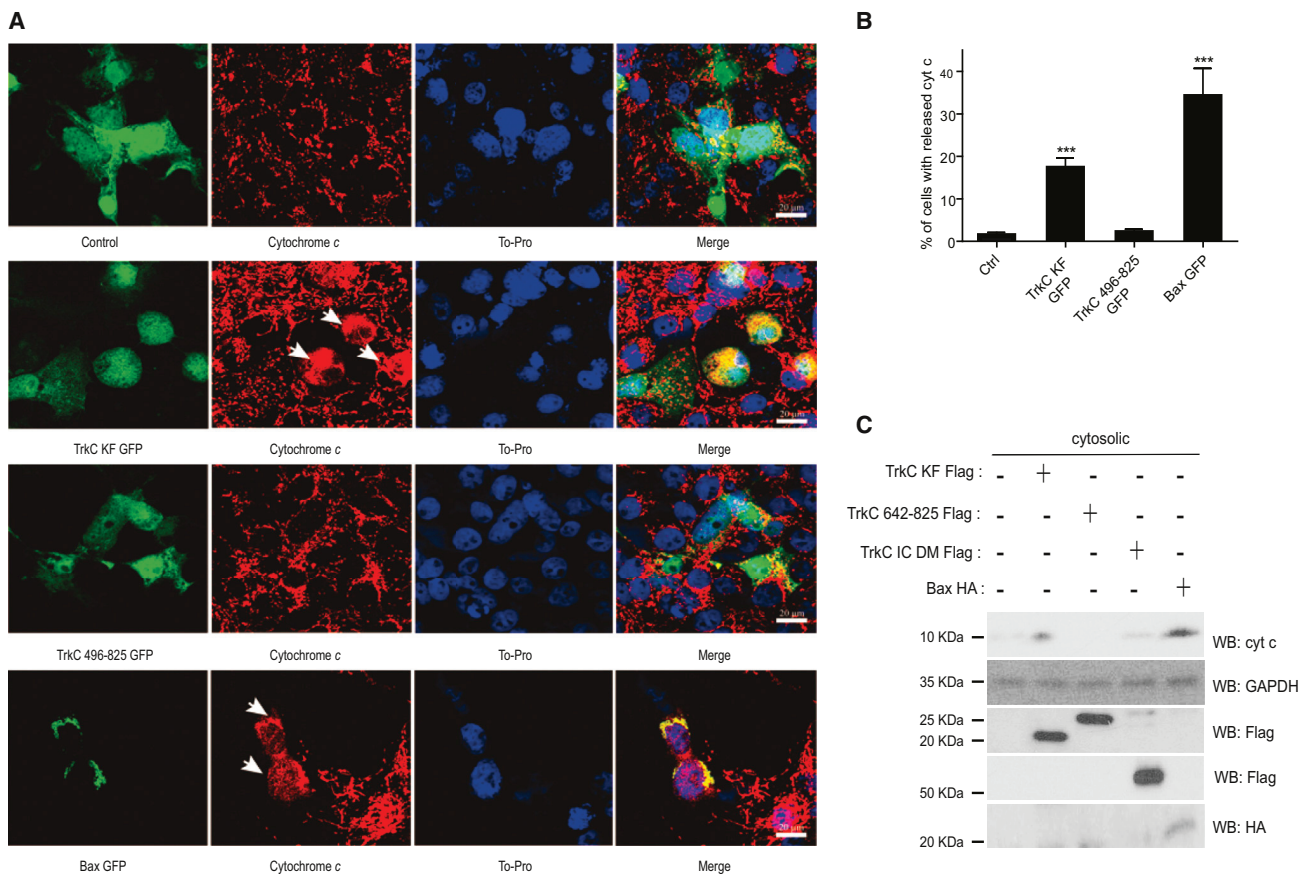


Figure 6. TrkC KF Induces Cytochrome c Release

(A) Confocal analysis in TrkC KF transfected COS-7 for studying cytochrome c release. COS-7 cells were stained with an antibody against cytochrome c. Cells displaying a representative cytochrome c release in the cytoplasm are indicated by arrow heads.

(B) The percentage of COS-7 cells with released cytochrome c was quantified. Data represent mean $\pm$ SEM. *** $p < 0.001$ (two-sided Mann-Whitney test) in comparison to control.

(C) TrkC KF induces the release of cytochrome c from the intermembrane mitochondrial space, as revealed by the anticcytochrome c western blot on the cytoplasmic fraction of A549 cells obtained by digitonin permeabilization.

Nikoletopoulou et al. (2010) have proposed that TrkA-induced cell death requires the recruitment of $p75^{\text{NTR}}$, which serves as the trigger for the induction of cell death. Although other mechanisms are probably involved in $p75^{\text{NTR}}$ -mediated cell death (Ichim et al., 2012), $p75^{\text{NTR}}$ may trigger apoptosis through the activation of this intrinsic pathway via a C-terminal domain with the intrinsic ability to induce cytochrome c release (Rabizadeh et al., 2000; Wang et al., 2000). Along with the view that TrkA-induced cell death is associated with the cleavage of $p75^{\text{NTR}}$ (Nikoletopoulou et al., 2010), it is tempting to speculate that both TrkC and TrkA trigger apoptosis via the activation of the intrinsic pathway. Additional work will be required to determine the precise biochemical mechanisms allowing mitochondrial membrane permeabilization by the TrkC KF or the intracellular domain of $p75^{\text{NTR}}$. It will be of interest to determine whether the cleavage of TrkC by caspases is the only mechanism utilized by TrkC to trigger the engagement of the intrinsic apoptosis pathway or whether $p75^{\text{NTR}}$, which has been shown to interact with TrkC (Bibel et al., 1999), may complement this mechanism.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Cell Culture and Transfection

A549, HEK 293T, MEF, COS-7, MCF10A, and HeLa Omi-mCherry cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Life Technologies) and supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Lonza), and N2A cells were grown in DMEM and F-12 and GlutaMAX (Life Technologies) and supplemented with 10% FBS (Lonza). The plasmid constructs were transfected with calcium phosphate for immunoprecipitations or jetPRIME (Polyplus Transfection) for cell death assays, and the siRNA was transfected with Lipofectamine RNAiMAX (Life Technologies) following the manufacturer's instructions.

Plasmid Construction

The full-length TrkC, TrkC 1–495, and Neogenin ICD GFP were described previously (Goldschneider et al., 2008; Tauszig-Delamasure et al., 2007). See also the Supplemental Information.

Two-Hybrid Screen

The two-hybrid screen was performed by Hybrigenics with the Mouse Embryo Brain RP2 Library as a prey and pB27 (N-LexA-bait-C fusion) and pB66 (N-GAL4-bait-C fusion) vectors. TrkC KF construct was used as bait.

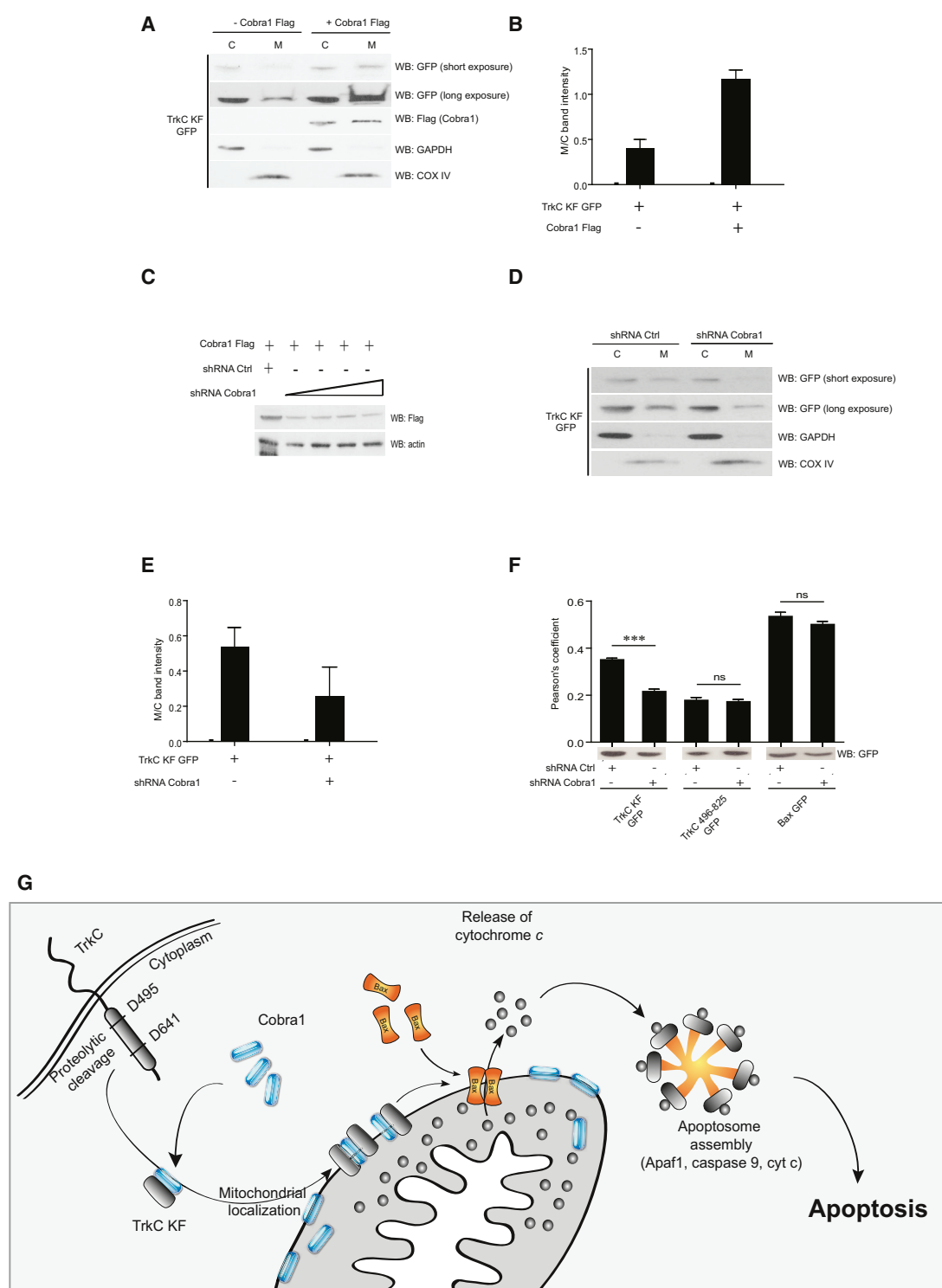


Figure 7. Cobra1 Controls the Mitochondrial Localization of TrkC KF

(A and B) The ectopic expression of Cobra1 in HEK 293T cells enhances the mitochondrial localization of TrkC KF. Cell fractionation was performed. The mitochondrial (M) and cytosolic (C) fractions are indicated. “Short” and “long” indicate different exposure times of the GFP immunolabeling and quantification as a ratio (M/C, mitochondrial fraction over cytosolic fraction) is shown in (B). Data represent mean $\pm$ SEM.

(C) Immunoblot showing Cobra1 level upon transfection with the shCobra1 plasmid. Cobra1 was expressed in HEK 293T cells along with an increasing concentration of shCobra1 plasmid.

(legend continued on next page)

Cell Death Assays

Caspase-3 activity and trypan blue exclusion were measured as described previously (Bouzas-Rodriguez et al., 2010) with the Ac-DEVD-AFC substrate assay (BioVision, K105-400), and total cell death index was measured with the ToxiLight assay (Lonza, LT07-117).

Immunoprecipitation and Western Blotting

HEK 293T cells or a fresh dissected mouse brain (C57Bl/6) were lysed in 50 mM HEPES (pH 7.6), 125 mM NaCl, 5 mM EDTA, and 0.1% to 1% NP-40 in the presence of proteases inhibitors and incubated with the antibodies described in the Supplemental Information.

Immunofluorescence

COS-7 cells, A549 cells, and DRG neurons were cultured on coverslips, fixed for 20 min in 4% paraformaldehyde, and permeabilized in PBS and 0.2% Triton. Then, the cells were treated with the antibodies described in the Supplemental Information.

Subcellular Fractionation

N2A cells were transfected with TrkC 496-825 GFP, TrkC KF GFP, Bax GFP, and GFP plasmids with jetPRIME. After 4 hr, the medium was replaced with medium without serum. Cells were harvested, and the pellet was resuspended in Resuspension Buffer (210 mM sorbitol, 70 mM sucrose, 1 mM EDTA, 10 mM HEPES, and 0.1% BSA [pH 7.5]). Cells were permeabilized by striking with loose and tight dounce tissue grinders (Sigma-Aldrich). Heavy membranes, cytosol, and mitochondria were separated by centrifugation.

Cytochrome c Release

The mitochondria were obtained from N2A cells with the Mitochondria Isolation Kit (Thermo Scientific, 89874) according to the manufacturer's instructions (see the Supplemental Information).

Mitochondrial Subfractionation

The separation of the intermembrane space and matrix proteins from those that are membrane bound was performed as described previously (Stojanovski et al., 2007) and in more detail in the Supplemental Information.

Brains Extract Mitochondrial Enrichment

Mitochondria were enriched in adult mouse brain extract as described previously (Fernández-Vizarra et al., 2011) and in the Supplemental Information. Animal experiments have been validated by an ethical committee (CECAPP 2010 022).

Sensory Neuron Dissociation, Culture, and Injection

For the immunofluorescence, DRG neurons were dissected from OF1 mice at E14, dissociated, and cultured on polylysine (Sigma-Aldrich) and in a cultured medium DMEM F12 (Life Technologies) supplemented with B27 (Life Technologies) and 50 ng/ml NT-3 (Abcam) 4 days before labeling. For the microinjection studies, the neurons were grown and injected as described previously (Tauszig-Delamasure et al., 2007) except the culture medium was neurobasal supplemented with B27 (Life Technologies).

Chick Embryo Electroporation

Cell death analysis in the developing chick neural tube was performed with fertilized chicken eggs obtained from a local farm and incubated at 38°C for 43 hr. Embryos were staged according to HH stages. Chick embryos of 19–25 somites (HH13–HH15) were electroporated with purified plasmid DNA

or siRNA or pshRNA along with GFP unilaterally. The electroporation was performed with the following parameters: voltage, 25 V; pulse length, 50 ms; interval, 950 ms; 5 pulses. The surviving embryos were dissected 24 hr after electroporation. Cryosection and staining are described in the Supplemental Information.

RNA Isolation and Quantitative Real-Time RT-PCR

To assay Cobra1 expression, we extracted total RNA from cells using the NucleoSpin RNA II Kit (Macherey-Nagel). One microgram of RNA was reverse transcribed with the iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad). Real-time quantitative RT-PCR (qRT-PCR) was performed with a LightCycler 480 (Roche Applied Science) and the FastStart TaqMan Probe Master mix (Roche).

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information contains Supplemental Experimental Procedures and four figures and can be found with this article online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2013.08.021>.

ACKNOWLEDGMENTS

We wish to thank M.P. Cros for precious support regarding confocal microscopy and image analysis and S. Tait and R. Macintosh for their support during revision. We thank J. Bouzas-Rodriguez for two-hybrid constructs and L. Giraud and E. Nouri for technical assistance. We thank D.R. Green, R. Youle, R. Li, and Y.A. Barde for materials. We also thank H. Bilak and D. Bredesen for correcting this manuscript. This work was supported by institutional grants from CNRS, INSERM, Centre Léon Bérard, and the University of Lyon as well as grants from the Ligue Contre le Cancer, Institut National du Cancer, Agence Nationale de la Recherche, Association pour la Recherche sur le Cancer, Canceropôle Lyon Auvergne Rhône-Alpes, European Research Council, and Academy of Finland program 11186236 (Finnish Centre of Excellence Program 2008–2013). G.I. and M.M. were supported by a fellowship from La Ligue Nationale Contre le Cancer. J.M.C.-A. was supported by a doctoral fellowship from Institut National du Cancer.

Received: April 20, 2012

Revised: April 28, 2013

Accepted: August 9, 2013

Published: September 12, 2013

REFERENCES

- Amleh, A., Nair, S.J., Sun, J., Sutherland, A., Hasty, P., and Li, R. (2009). Mouse cofactor of BRCA1 (Cobra1) is required for early embryogenesis. *PLoS ONE* 4, e5034.
- Bernd, P., and Li, R. (1999). Differential expression of *trkC* mRNA in the chicken embryo from gastrulation to development of secondary brain vesicles. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 116, 205–209.
- Bibel, M., and Barde, Y.A. (2000). Neurotrophins: key regulators of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous system. *Genes Dev.* 14, 2919–2937.
- Bibel, M., Hoppe, E., and Barde, Y.A. (1999). Biochemical and functional interactions between the neurotrophin receptors *trk* and *p75NTR*. *EMBO J.* 18, 616–622.
- Bouzas-Rodriguez, J., Cabrera, J.R., Delloye-Bourgeois, C., Ichim, G., Delcros, J.G., Raquin, M.A., Rousseau, R., Combaret, V., Bénard, J.,

(D and E) Cobra1 silencing impairs TrkC KF mitochondrial localization. TrkC KF GFP was transfected in HEK 293T cells with or without shCobra1, and cell fractionation was performed. GFP immunoblot is shown. The intensity of the bands has been quantified and is represented as a ratio (M/C, mitochondrial fraction over cytosolic fraction) in (E). Data represent mean $\pm$ SEM.

(F) The silencing of Cobra1 in COS-7 cells reduces the colocalization index (Pearson's coefficient) between TrkC KF GFP and the MitoTracker. Data represent mean $\pm$ SEM. *** $p < 0.001$ (ns, nonsignificant; two-sided Mann-Whitney test) in comparison to control.

(G) A model of Cobra1's involvement in TrkC-induced apoptosis via the mitochondrial intrinsic pathway. The unliganded TrkC is cleaved by caspases, releasing TrkC KF, which localizes at the mitochondria. This shuttling seems to require Cobra1. Furthermore, TrkC KF is able to release cytochrome c and, thus, initiates the classical cascade of the intrinsic apoptosis.

- Tauszig-Delamasure, S., and Mehlen, P. (2010). Neurotrophin-3 production promotes human neuroblastoma cell survival by inhibiting TrkC-induced apoptosis. *J. Clin. Invest.* 120, 850–858.
- Bredesen, D.E., Mehlen, P., and Rabizadeh, S. (2004). Apoptosis and dependence receptors: a molecular basis for cellular addiction. *Physiol. Rev.* 84, 411–430.
- 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.
- Castets, M., Broutier, L., Molin, Y., Brevet, M., Chazot, G., Gadot, N., Paquet, A., Mazelin, L., Jarrosson-Wuillaume, L., Scoazec, J.Y., et al. (2012). DCC constrains tumour progression via its dependence receptor activity. *Nature* 482, 534–537.
- Delloye-Bourgeois, C., Brambilla, E., Coissieux, M.M., Guenebeaud, C., Pedoux, 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.
- Fariñas, I., Yoshida, C.K., Backus, C., and Reichardt, L.F. (1996). Lack of neurotrophin-3 results in death of spinal sensory neurons and premature differentiation of their precursors. *Neuron* 17, 1065–1078.
- Fernández-Vizarrá, E., Enríquez, J.A., Pérez-Martos, A., Montoya, J., and Fernández-Silva, P. (2011). Tissue-specific differences in mitochondrial activity and biogenesis. *Mitochondrion* 11, 207–213.
- Forcet, C., Ye, X., Granger, L., Corset, V., Shin, H., Bredesen, D.E., and Mehlen, P. (2001). The dependence receptor DCC (deleted in colorectal cancer) defines an alternative mechanism for caspase activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 3416–3421.
- Furne, C., Rama, N., Corset, V., Chédotal, A., and Mehlen, P. (2008). Netrin-1 is a survival factor during commissural neuron navigation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 14465–14470.
- Goldschneider, D., and Mehlen, P. (2010). Dependence receptors: a new paradigm in cell signaling and cancer therapy. *Oncogene* 29, 1865–1882.
- Goldschneider, D., Rama, N., Guix, C., and Mehlen, P. (2008). The neogenin intracellular domain regulates gene transcription via nuclear translocation. *Mol. Cell Biol.* 28, 4068–4079.
- Guenebeaud, C., Goldschneider, D., Castets, M., Guix, C., Chazot, G., Delloye-Bourgeois, C., Eisenberg-Lerner, A., Shohat, G., Zhang, M., Laudet, V., et al. (2010). The dependence receptor UNC5H2/B triggers apoptosis via PP2A-mediated dephosphorylation of DAP kinase. *Mol. Cell* 40, 863–876.
- Ichim, G., Tauszig-Delamasure, S., and Mehlen, P. (2012). Neurotrophins and cell death. *Exp. Cell Res.* 318, 1221–1228.
- Lawson, S.N., and Biscoe, T.J. (1979). Development of mouse dorsal root ganglia: an autoradiographic and quantitative study. *J. Neurocytol.* 8, 265–274.
- Li, H., Zhu, H., Xu, C.J., and Yuan, J. (1998). Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 94, 491–501.
- Llambi, F., and Green, D.R. (2011). Apoptosis and oncogenesis: give and take in the BCL-2 family. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 21, 12–20.
- Llambi, F., Lourenço, 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.
- Matsunaga, E., Tauszig-Delamasure, S., Monnier, P.P., Mueller, B.K., Strittmatter, S.M., Mehlen, P., and Chédotal, A. (2004). RGM and its receptor neogenin regulate neuronal survival. *Nat. Cell Biol.* 6, 749–755.
- McGregor, L.M., Baylin, S.B., Griffin, C.A., Hawkins, A.L., and Nelkin, B.D. (1994). Molecular cloning of the cDNA for human TrkC (NTRK3), chromosomal assignment, and evidence for a splice variant. *Genomics* 22, 267–272.
- Mehlen, P., and Bredesen, D.E. (2004). The dependence receptor hypothesis. *Apoptosis* 9, 37–49.
- 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., Delloye-Bourgeois, C., and Chédotal, A. (2011). Novel roles for Slits and netrins: axon guidance cues as anticancer targets? *Nat. Rev. Cancer* 11, 188–197.
- Mille, F., Llambi, F., Guix, C., Delloye-Bourgeois, C., Guenebeaud, C., Castro-Obregon, S., Bredesen, D.E., Thibert, C., and Mehlen, P. (2009). Interfering with multimerization of netrin-1 receptors triggers tumor cell death. *Cell Death Differ.* 16, 1344–1351.
- Mohd-Ismael, N.K., Deng, L., Sukumaran, S.K., Yu, V.C., Hotta, H., and Tan, Y.J. (2009). The hepatitis C virus core protein contains a BH3 domain that regulates apoptosis through specific interaction with human Mcl-1. *J. Virol.* 83, 9993–10006.
- Naresh, A., Long, W., Vidal, G.A., Wimley, W.C., Marrero, L., Sartor, C.I., Tovey, S., Cooke, T.G., Bartlett, J.M., and Jones, F.E. (2006). The ERBB4/HER4 intracellular domain 4ICD is a BH3-only protein promoting apoptosis of breast cancer cells. *Cancer Res.* 66, 6412–6420.
- Nikoletopoulou, V., Lickert, H., Frade, J.M., Rencurel, C., Giallonardo, P., Zhang, L., Bibel, M., and Barde, Y.A. (2010). Neurotrophin receptors TrkA and TrkB cause neuronal death whereas TrkB does not. *Nature* 467, 59–63.
- Pinco, O., Carmeli, C., Rosenthal, A., and Kalcheim, C. (1993). Neurotrophin-3 affects proliferation and differentiation of distinct neural crest cells and is present in the early neural tube of avian embryos. *J. Neurobiol.* 24, 1626–1641.
- Rabizadeh, S., Oh, J., Zhong, L.T., Yang, J., Bitler, C.M., Butcher, L.L., and Bredesen, D.E. (1993). Induction of apoptosis by the low-affinity NGF receptor. *Science* 261, 345–348.
- Rabizadeh, S., Ye, X., Sperandio, S., Wang, J.J., Ellerby, H.M., Ellerby, L.M., Giza, C., Andrusiak, R.L., Frankowski, H., Yaron, Y., et al. (2000). Neurotrophin dependence domain: a domain required for the mediation of apoptosis by the p75 neurotrophin receptor. *J. Mol. Neurosci.* 15, 215–229.
- Sayan, B.S., Sayan, A.E., Knight, R.A., Melino, G., and Cohen, G.M. (2006). p53 is cleaved by caspases generating fragments localizing to mitochondria. *J. Biol. Chem.* 281, 13566–13573.
- Stojanovski, D., Pfanner, N., and Wiedemann, N. (2007). Import of proteins into mitochondria. *Methods Cell Biol.* 80, 783–806.
- Strohecker, A.M., Yehiely, F., Chen, F., and Cryns, V.L. (2008). Caspase cleavage of HER-2 releases a Bad-like cell death effector. *J. Biol. Chem.* 283, 18269–18282.
- Sun, J., Pan, H., Lei, C., Yuan, B., Nair, S.J., April, C., Parameswaran, B., Klotzle, B., Fan, J.B., Ruan, J., and Li, R. (2011). Genetic and genomic analyses of RNA polymerase II-pausing factor in regulation of mammalian transcription and cell growth. *J. Biol. Chem.* 286, 36248–36257.
- Tait, S.W., Parsons, M.J., Llambi, F., Bouchier-Hayes, L., Connell, S., Muñoz-Pinedo, C., and Green, D.R. (2010). Resistance to caspase-independent cell death requires persistence of intact mitochondria. *Dev. Cell* 18, 802–813.
- 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.
- Tauszig-Delamasure, S., Yu, L.Y., Cabrera, J.R., Bouzas-Rodríguez, J., Mermet-Bouvier, C., Guix, C., Bordeaux, M.C., Arumäe, U., and Mehlen, P. (2007). The TrkC receptor induces apoptosis when the dependence receptor notion meets the neurotrophin paradigm. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 13361–13366.
- Teillet, M.A., Kalcheim, C., and Le Douarin, N.M. (1987). Formation of the dorsal root ganglia in the avian embryo: segmental origin and migratory behavior of neural crest progenitor cells. *Dev. Biol.* 120, 329–347.

- 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, J.J., Rabizadeh, S., Tasinato, A., Sperandio, S., Ye, X., Green, M., Assa-Munt, N., Spencer, D., and Bredesen, D.E. (2000). Dimerization-dependent block of the proapoptotic effect of p75(NTR). *J. Neurosci. Res.* 60, 587–593.
- Yamaguchi, Y., Takagi, T., Wada, T., Yano, K., Furuya, A., Sugimoto, S., Hasegawa, J., and Handa, H. (1999). NELF, a multisubunit complex containing RD, cooperates with DSIF to repress RNA polymerase II elongation. *Cell* 97, 41–51.
- Ye, Q., Hu, Y.F., Zhong, H., Nye, A.C., Belmont, A.S., and Li, R. (2001). BRCA1-induced large-scale chromatin unfolding and allele-specific effects of cancer-predisposing mutations. *J. Cell Biol.* 155, 911–921.
- Yung, T.M., Narita, T., Komori, T., Yamaguchi, Y., and Handa, H. (2009). Cellular dynamics of the negative transcription elongation factor NELF. *Exp. Cell Res.* 315, 1693–1705.

Molecular Cell, Volume 18
Supplemental Information

**The Dependence Receptor TrkC
Triggers Mitochondria-Dependent Apoptosis
upon Cobra-1 Recruitment**

Gabriel Ichim, Anne-Laure Genevois, Marie Ménard, Li-Ying Yu, Juliana M. Coelho-Aguiar, Fabien Llambi, Loraine Jarrosson-Wuilleme, Jonathan Lefebvre, David Tulasne, Elisabeth Dupin, Nicole Le Douarin, Urmas Arumăe, Servane Tauszig-Delamasure, and Patrick Mehlen

Supplementary Figure 1

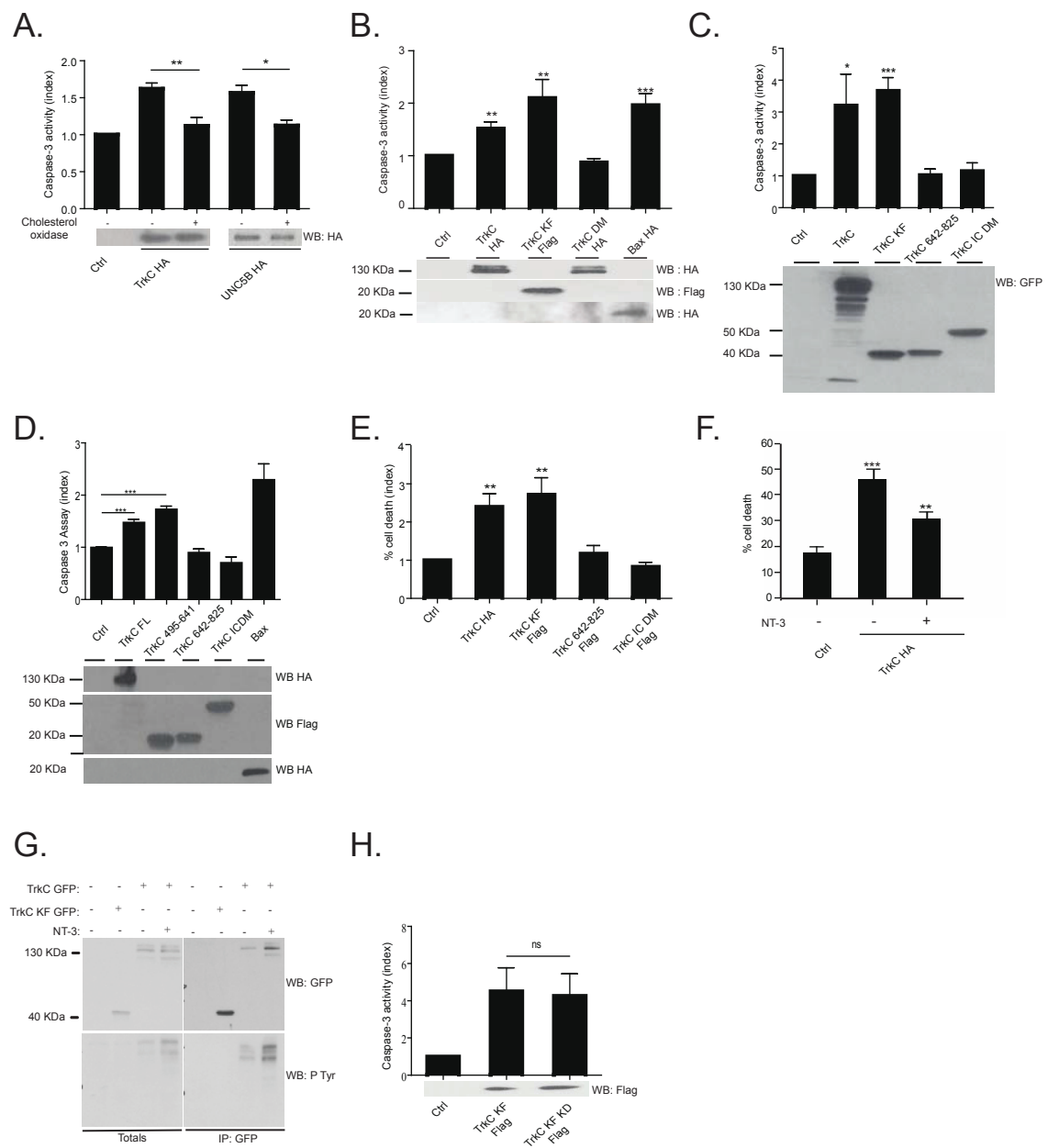


Figure S1. TrkC Proapoptotic Activity Is Described in Settings of Receptor Cleavage, NT-3 Availability, Cellular Localization, and Kinase Activity, Related to Figure 1

(A) Caspase-3 assay on A549 cells transfected with TrkC or UNC5B treated or not with cholesterol oxidase (2U/ml).

(B–E) Caspase-3 and Toxilight assays on A549 cells (B and C) and Cos-7 cells (D and E) transfected with the indicated constructs.

(F) Trypan blue assay on HEK293T transfected with TrkC and treated or not with NT-3 (50ng/μl).

(G) Transfected TrkC KF GFP in HEK293T cells was immunoprecipitated and probed with an anti-phosphotyrosine antibody.

(H) Caspase-3 assay on A549 cells with the mutant TrkC KF Kinase Dead (TrkC KF KD). For caspase-3 and Toxilight assays, data represent mean ± SEM. *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, 2-sided Mann-Whitney test, compared with control.

Supplementary Figure 2

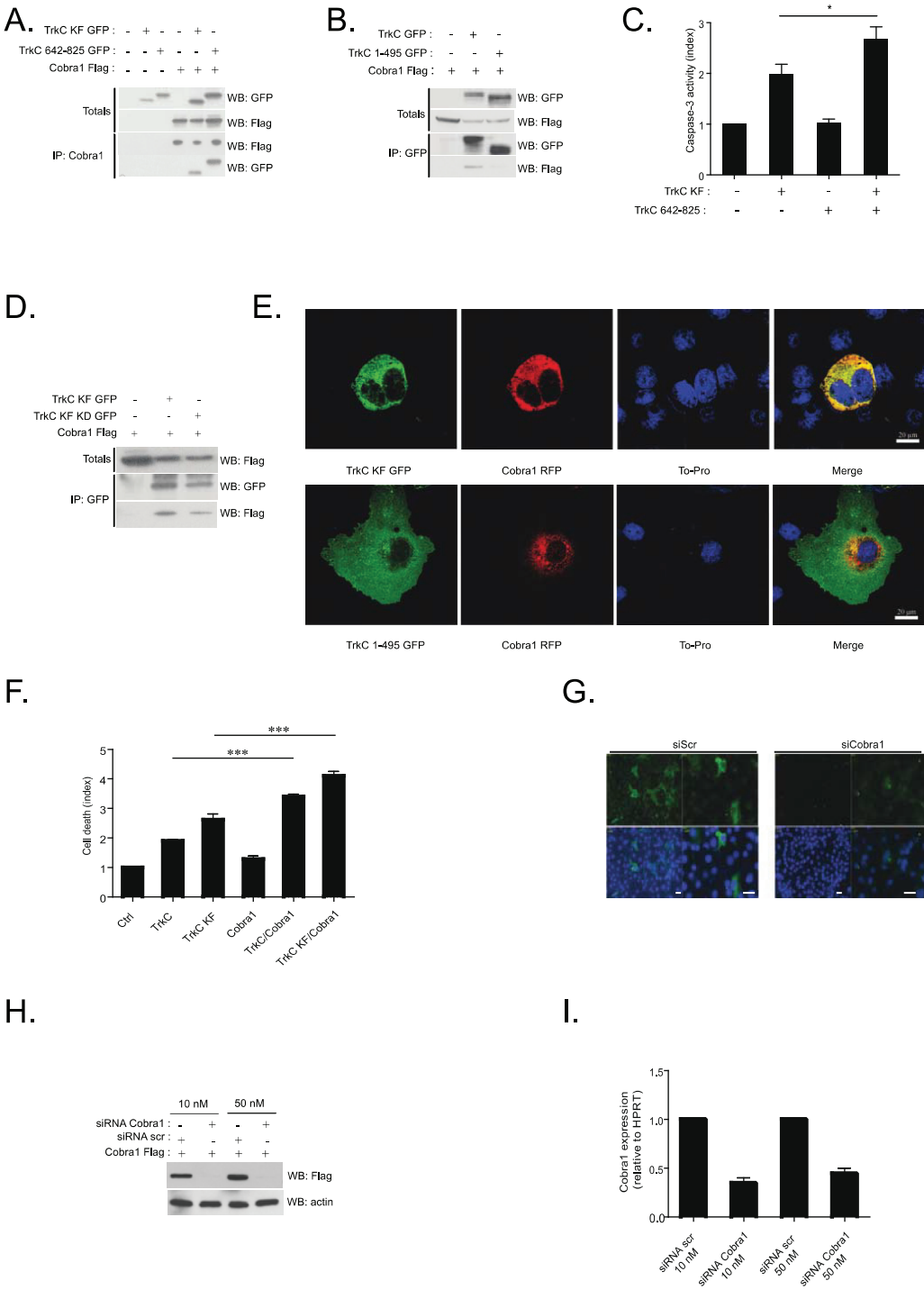


Figure S2. Cobra1 interacts with the TrkC Receptor, Related to Figure 2

(A) Cobra1 was immunoprecipitated in HEK293T cells using an anti-Cobra1 antibody and the interaction with TrkC KF GFP and TrkC 642-825 GFP was revealed by an anti-GFP western blot.

(B) While Cobra1 interacts with full length TrkC, it does not with TrkC 1-495.

(C) Co-expression TrkC 642-825 enhances TrkC KF induced caspase 3 activity in A549 cells. Data represent mean $\pm$ SEM. $^*P < 0.1$, 2-sided Mann-Whitney test, compared with control.

(D) Immunoprecipitated TrkC KF KD GFP interacts with Cobra1 in HEK293T cells.

(E) Confocal imaging on COS-7 cells showing the colocalization between Cobra1 RFP, TrkC KF GFP and TrkC 1-495 GFP.

(F) Co-expression of Cobra1 enhances cell death induced by both TrkC and TrkC KF as toxilight assay in HEK293T cells. Data represent mean $\pm$ SEM. $***P < 0.001$, 2-sided Mann-Whitney test, compared with control.

(G) The efficacy of Cobra1 siRNA on ectopically expressed Cobra1 in COS7 cells and detected by immunofluorescence using a Cobra1 antibody.

(H and I) The efficacy of Cobra1 siRNA on ectopically expressed Cobra1 in HEK293T cells (H) and endogenous Cobra1 in A549 cells (I). A scramble siRNA (siRNA scr) is used as a control. Data represent mean $\pm$ SEM.

Supplementary Figure 3

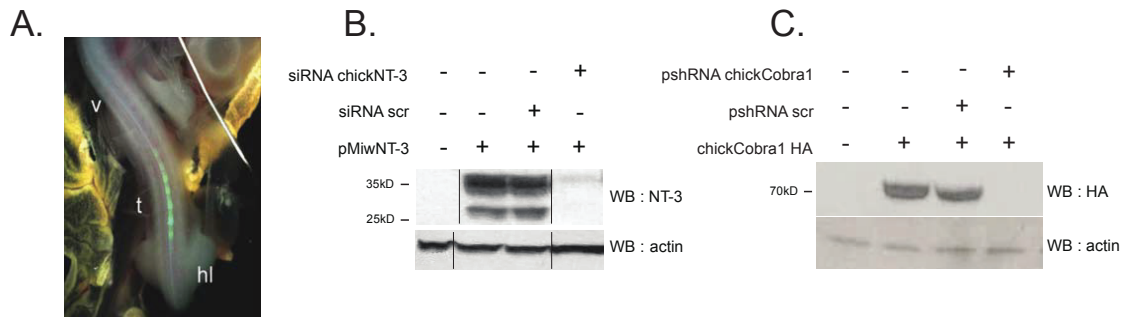


Figure S3. Invalidation of chickNT-3 and chickCobra1 in Chick Embryo, Related to Figure 3

(A) Representative picture of a dissected chick embryo, 24h after electroporation. The GFP positive neural tube can be observed in the trunk (t). hl: hindlimb, v: vagal neural crest.

(B) The efficacy of chickNT-3 siRNA on ectopically expressed chickNT-3 in HEK293T cells. Both the pro- and the active form are invalidated.

(C) The efficacy of pshchickCobra1 on ectopically expressed chickCobra1 in HEK293T.

Supplementary Figure 4

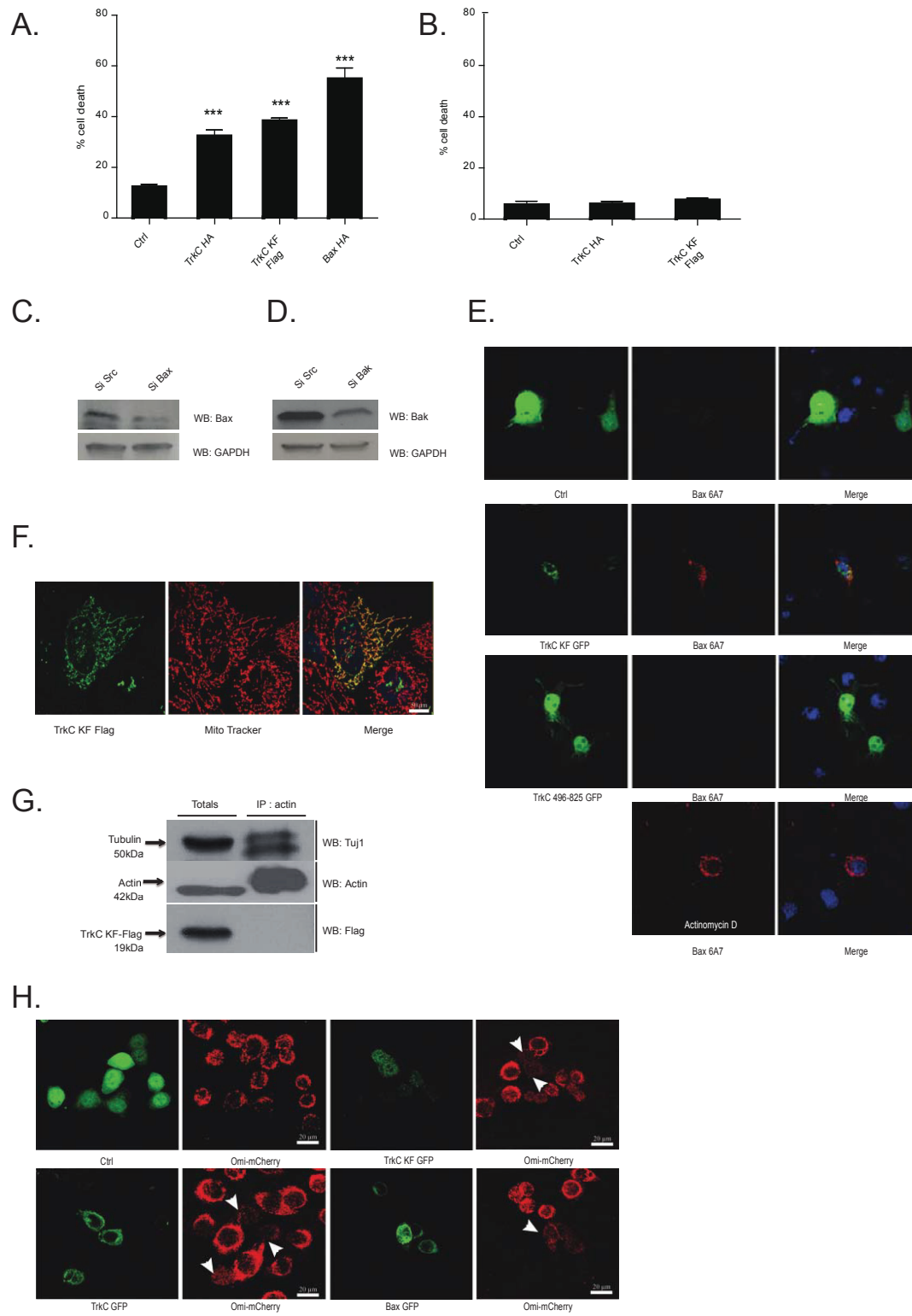


Figure S4. TrkC KF Causes the Release of the Mitochondrial Cytochrome c and Omi, Related to Figure 4

(A and B) Trypan blue cell death assay on wild type (A) and Bak/Bax-deficient (B) MEFs. Data represent mean $\pm$ SEM. *** $P < 0.001$, 2-sided Mann-Whitney test, compared with control.

(C and D) Efficacy of the Bax (C) and the Bak siRNA (D) on endogenous Bax and Bak in A549 cells.

(E) Cos7 cells were transfected with TrkC KF GFP and TrkC 496-825 GFP, treated with z-VAD to avoid apoptosis amplification and cell destruction and immunostained for active Bax (6A7 clone). Actinomycin D (500 ng/ml) was used as positive control.

(F) MCF10A cells were immunostained with anti-Flag antibody following transfection of TrkC KF Flag and treated with z-VAD. Mito Tracker Red CMXRos was used to stain the mitochondria.

(G) N2A cells were transfected with TrkC KF Flag and immunoprecipitated with an antibody anti-actin. Tubulin was revealed by a Tuj1 antibody. While detected in the total extract by an anti-Flag antibody, TrkC KF Flag was undetectable among the proteins pulled down by the anti-actin antibody.

(H) Confocal imaging on Hela cells stably expressing Omi-mCherry showing the mitochondrial release of Omi when TrkC GFP, TrkC KF GFP or Bax GFP are ectopically expressed but not when TrkC 495-825 GFP is expressed. Cells were treated with z-VAD as in (E). Arrowheads show the diffuse labelling of Omi when it is released in the cytoplasm.

Supplemental Experimental Procedures

Cloning and Constructs

TrkC 496-641 Flag (TrkC KF Flag) and TrkC 642-825 Flag were subcloned into the p3XFlag-CMV10 (Sigma-Aldrich) using PCR-obtained inserts with the following primers 5'-CGC AAGCTTGCTGGGCCGGATACAG-3' containing the HindIII restriction site and 5'-CGCGGTACCAgTTACACAAGGATCATCGCATC-3' with the KpnI restriction site for TrkC KF Flag and 5'- CGCAAGCTTGGACAGCCACGCC-3' containing the HindIII restriction site and 5'-CGCGGTACCGACTAGCCAAGAATGTCC-3' with the KpnI site for TrkC 642-825 Flag construct. The TrkC KF Kinase Dead D572N (TrkC KF KD Flag) plasmid was done by site-directed mutagenesis on the TrkC KF Flag plasmid using the following primers 5'-GATGCTTGTGGCAGTGAACGCCCTGAAGGATCCC-3' and 5'-GGGATCCTTCAGGGCGTTCAGTCCACAAGCATC-3'. TrkC IC DM plasmid coding for the intracellular part of TrkC mutated for both cleavage sites (TrkC IC D495N/D641N) was subcloned into the p3XFlag-CMV10 plasmid between KpnI and XbaI sites (Tauszig-Delamasure et al., 2007).

Full length TrkC GFP, TrkC KF GFP, TrkC 495-825 GFP and TrkC 1-495 GFP were subcloned into the pEGP-N3 (Clontech) using the following primers: 5'-CGCAAGCTTCGATGGATGTCTCTCTTTGC-3' containing HindIII restriction site and 5'-CGCGGTACCGCCAAGAATGTCC-3' with KpnI restriction site for TrkC GFP; 5'-CGCGCTAGCATGGATGCTGGGC-3' with NheI restriction site and 5'-CGCAAGCTTCATCCACAAGGATCATCGCATC-3' with HindIII restriction site for TrkC KF GFP; 5'- CGCAAGCTTCGATGGCTGGGCCGG-3' with HindIII restriction site and 5'-

CGCGGTACCGCCAAGAATGTCCAGG-3' with KpnI restriction site for TrkC 495-825 GFP; 5'- CGCAAGCTTCGATGGATGTCTCTCTTTGC-3' with HindIII restriction site and 5'- CGCGGTACCCAGCGATGAAGGTG-3' with KpnI restriction site for TrkC 1-495 GFP. Cobra RFP plasmid was designed by subcloning the PCR-amplified human Cobra1 with the 5'- CGCGAATTCTTTCGCGGGGCTGC-3' primer containing the EcoRI restriction site and 5'- CGCGGATCCGAGCGGGGC-3' primer with the BamHI restriction site into the pEYFP-C1 plasmid (Clontech) in which the YFP was previously replaced with RFP coding cDNA. Cobra1.1 Flag and Cobra1.2 Flag plasmids were designed through site-directed mutagenesis (Stratagene) using the following STOP codon-containing primers: 5'- GCAGTACATCCTGTAGAAGGAGAGCGC-3' and 5'- GCGCTCTCCTTCTACAGGATGTACTGC-3' for Cobra1.1 Flag and 5'- GAGCTGGTTCGGCTAGGAGACACTGCC-3' and 5'- GGCAGTGTCTCCTAGCCGACCAGCTC-3' for Cobra1.2 Flag. The Cobra1.3 Flag plasmid was obtained by subcloning into p3XFlag-CMV10 the PCR-generated insert using 5'- CGCGAATTCAGAGACACTGCCC-3' containing EcoRI restriction site and 5'- CGC GGTACCGATCAGAGCGGGGC-3' with KpnI restriction site. Bax GPF plasmid was purchased from Addgene, the Cobra1 Flag plasmid was a gift from Pr. Rong Li (UT Health Health Science Center, San Antonio, USA) while TrkA and TrkB were kindly provided by Pr. Yves-Alain Barde (Biozentrum, Basel, Switzerland). Chick NT-3 was subcloned by PCR on cDNA purified from chick embryo skin (E10 stage) with the following primers 5'-CACCC ATG TCC ATC TTG TTT TAT GTG ATA TTT C - 3' and 5'- TTA TGT TCT TCC TAT TTT TCT TGA CAA TG - 3' into a pcDNA3.1 directional (Invitrogen) and transferred into a pMiw (Kishimoto et al., 2002) chick expression vector with KpnI/EcoRV sites. pshchickCobra was generated in pSilencer 1.0-U6 (Ambion) with

the following primers : 5'-GCT GAT AAG GAT TTG TAT AAA TTC AAG AGA TTT ATA CAA ATC CTT ATC AGC TTTTTT 3'- and 5'-AAT TAA AAA AGC TGA TAA GGA TTT GTA TAA ATC TCT TGA ATT TAT ACA AAT CCT TAT CAG CGG CC-3'.

siRNA and shRNA

All siRNA were purchased by Sigma-ALDRICH: sihuBAX (SASI_hs02_00337363), sihuBAK (SASI_Hs02_00331326), sihuCobra1 (SASI_hs01_00236976), siratCobra1 (SASI_Rn02_00232565), simuCobra1 (SASI_Mm01_00110121), siRNA scramble (SIC001), shhuCobra1 (SHCLND-NM_015456) and self designed sichickNT-3 (chickNT-3.2s (GCCAGUUAUUUCAUGGAU) chickNT-3.2a (AUCCAUUGAAAUAAACUGGC)).

Immunofluorescence

COS-7 cells, A549 cells, the DRG neurons were cultured on coverslips, then fixed 20 minutes in 4% paraformaldehyde and permeabilized in PBS / 0.2% Triton. The cells were then incubated for 1 hour with the appropriate primary antibody: anti-panTrk (Santa Cruz, C14, 1/150), anti-TrkC (Santa Cruz, H300, 1/100), anti-Cobra1 (Santa Cruz, 1/150), anti-activated Bax (Santa Cruz, clone 6A7, sc-23959, 1/150) and anti-cytochrome c (Pharmigen, 65971A, 1/300). After 3 washes in PBS, the cells were incubated for 1 hour with the respective secondary antibody coupled FITC or Cy3 (Jackson ImmunoResearch). The DNA was stained using To-Pro (Life Technologies) and the mitochondria were stained with Mito Tracker Red CMXRos (Life Technologies). Images were obtained by confocal microscopy and analyzed using Adobe Photoshop, ImageJ or LSM Image Browser.

Cytochrome c Release

The mitochondria were obtained from N2A cells using the Mitochondria Isolation Kit from Thermo Scientific (89874) according to the manufacturer's instructions. The mitochondria were resuspended in Mitochondria Resuspension Buffer (200 mM sorbitol, 50 mM sucrose, 10 mM succinate, 10 mM Hepes pH 7.4, 0.1% BSA, 5 mM KPO₄ pH 7.4; solution at pH 7.5). The mitochondria were aliquoted and incubated at 37°C for 1h with the protein A-Sepharose beads bound to TrkC KF Flag, Cobra Flag, TrkC IC DM HA or Bax HA, purified from jetprime transfected N2A cells. Briefly, the cells were lysed with a RIPA/Protease Inhibitors solution during 1h at 4°C, then the proteins were immunoprecipitated using anti-Flag and anti-HA antibodies.

Mitochondrial Subfractionation

The separation of the inter-membrane space (IMS) and matrix proteins from those that are membrane bound was done as previously described (Stojanovski et al., 2007). Briefly, the isolated mitochondria were resuspended in extraction buffer (10 mM MOPS-KOH, pH 7,2 and 250 mM NaCl) and then sonicated (3 times 5 pulses, 30% duty cycle). For the separation, the extract was centrifuged at 20000 g for 1 hour at 4°C. The pellet contained membranes and membrane-associated proteins and the supernatant contains liberated soluble proteins. The supernatant was further concentrated using acetone.

Brains Extract Mitochondrial Enrichment

Mitochondria were enriched in mouse adult brain extract as previously described (Fernandez-Vizarra et al., 2011). Shortly, the brain slices were resuspended in 1 ml of

AT buffer (75 mM sucrose, 225 mM sorbitol, 1 mM EGTA, 0,1% BSA and 10 mM Tris-HCl, pH 7,4) and homogenized by 40 strokes with a glass/teflon Potter homogenizer. The homogenate was centrifuged at low speed (1000g for 5 min at 4°C) and the supernatant was spun at 9000g for 10 min at 4°C. The pellet enriched in mitochondria was washed twice in the AT buffer and further processed.

RNA Isolation and Quantitative Real-Time RT-PCR

To assay Cobra1 expression, total RNA was extracted from cells using the Nucleospin RNAII kit (Macherey-Nagel). One microgram of RNA was reverse-transcribed using the iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad). Real-time quantitative RT-PCR (Q-RT-PCR) was performed using a Light-Cycler 480 (Roche Applied Science) and the FastStart TaqMan Probe Master Mix (Roche Applied Science). Q-RT-PCR was performed using probe #68 (Roche Applied Science) and the following primers: Cobra1 forward 5'-tctcgatggcgtcaagaag-3' and reverse 5'-cacacaggatcatggacaggt-3'. The ubiquitously expressed human gene *hprt1* was used as internal control, using probe #73 (Roche Applied Science) and the following primers: forward 5'-TGACCTTGATTTATTTTGCATACC-3' and reverse 5'-CGAGCAAGACGTTTCAGTCCT-3'. For both couples of primers, polymerase was activated at 95 °C for 10 min, followed by 45 cycles of amplification and 30s of cooling.□

The electroporated chick embryo neural tubes were dissected and the GFP positive part was pooled with other samples for the same conditions if necessary. The GFP negative part was also extracted and used control. RNA was extracted and cDNA synthesised as described for cells. Real-time quantitative RT-PCR was performed using a LightCycler 2.0 apparatus (Roche) using the Light Cycler FastStart DNA Master SYBER Green I kit

(Roche). Q-RT-PCR was performed using the following primers: chickNT-3, forward 5'-CACC ATG TCC ATC TTG TTT TAT GTG ATA TTT C - 3' and reverse 5'- TTA TGT TCT TCC TAT TTT TCT TGA CAA TG - 3'. The ubiquitously expressed chick *beta actin* gene, was used as internal control, using the following primers: forward 5'-TGG CAA TGA GAG GTT CAG GT-3' and reverse 5'-CAG GAC TCC ATA CCC AAG AAA-3'. For all couples of primers, polymerase was activated at 95°C for 10 minutes, followed by 45 cycles at 95°C for 20 seconds, 64°C (*nt-3*) and 52°C(*beta actin*) for 20 seconds, and 72°C for 15 seconds and fusion 65°C for 30s.

Immunoprecipitation and Western Blotting

HEK293T cells or a fresh dissected mouse brain (C57Bl/6) were lysed in 50 mM HEPES pH 7.6, 125 mM NaCl, 5 mM EDTA and 0.1 to 1% NP-40 in the presence of proteases inhibitors, and further incubated with either anti-GFP (Torrey Pines Biolabs, TP401), anti-Cobra1 (Santa Cruz, sc-79991), anti-Flag (Sigma Aldrich, F3165) or anti-HA (Sigma Aldrich, H6908), anti-beta actin (Cell Signaling, 13E5 #4970) and then with protein A-Sepharose (Sigma Aldrich) to pull down the proteins of interest. For western blotting we used the additional antibodies: anti-panTrk (Santa Cruz, sc-139), anti-TrkC (Santa Cruz, sc-117), anti-Actin (Chemicon, MAB1501R), anti-tubulin Tuj1 (BabCO, MMS-435P), anti-GAPDH (Santa Cruz, sc-25778), anti-COXIV (Abcam, ab14744), anti-cytochrome c (Abcam, ab90529) and anti-phosphotyrosine (4G10, Millipore).

Cryosections and Staining

Dissected embryos were incubated in 4% paraformaldehyde for 24h and then in PBS/ 30% Sucrose for 24h, and embedded in Cryomount (Histolab). TUNEL staining was performed on cryostat sections (*In Situ* Cell Death Detection Kit, Roche Diagnostics), and nuclei were stained with Hoechst. Anti-caspase 3 (9661, Cell signaling, 1/250) immunostaining was performed as described previously for cell lines (Tauszig-Delamasure et al., 2007).

Tunel positive cells in the neural tube and in the region between the tube and the dermatome were counted on both side of the tube for all the sections corresponding to the electroporated part. A ratio of the TUNEL positive cells on the electoporated side upon those on the non-electroporated side was calculated for each section. A mean per section was then calculated. A U test was done to determine wether the difference between various conditions was significant.

Supplemental References

Kishimoto, K.N., Watanabe, Y., Nakamura, H., and Kokubun, S. (2002). Ectopic bone formation by electroporatic transfer of bone morphogenetic protein-4 gene. *Bone* 31, 340-347.

3 – Projets en cours

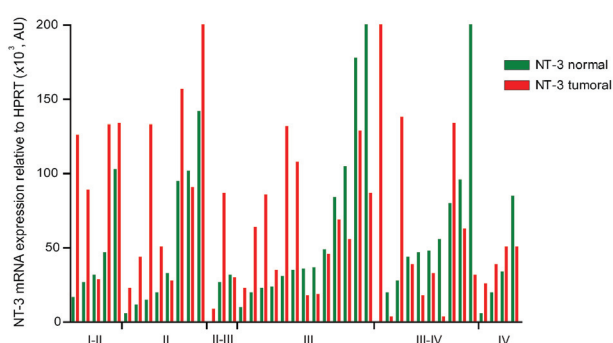
3.1 – Profil d'expression de *NT-3* et *TrkC*

Comme je l'ai déjà décrit, un premier aspect de mon travail de thèse avait pour but d'étendre la preuve de concept récemment établie au laboratoire dans le cas du neuroblastome, qui présente le couple NT-3/TRKC comme une cible thérapeutique potentielle (Bouzas-rodriguez et al., 2010). Mon objectif était donc d'étudier le rôle de TRKC comme récepteur à dépendance dans le contrôle d'autres types de cancers. Pour ce faire, j'ai analysé l'expression de *TrkC* et *NT-3* dans des cohortes d'échantillons de cancer du colon, du rein, du poumon et du sein, ainsi que dans un certain nombre de lignées cellulaires. Les résultats concernant la cohorte de colon ont fait l'objet de la publication présentée précédemment. Les autres résultats préliminaires obtenus sont présentés ci-après.

a) Cas du cancer du rein

J'ai obtenu des résultats préliminaires intéressants concernant le cancer du rein. En effet, j'ai analysé l'expression de *NT-3* et de *TrkC* par RT-qPCR dans une cohorte de 45 patients atteints de cancer du rein. Pour chaque patient, je disposais de tissu tumoral et du tissu normal associé. J'ai ainsi pu observer d'importantes variations de l'expression de *NT-3* et de *TrkC* entre le tissu normal et le tissu tumoral associé (Figures 1.AB, 2.AB).

1A.



1B.

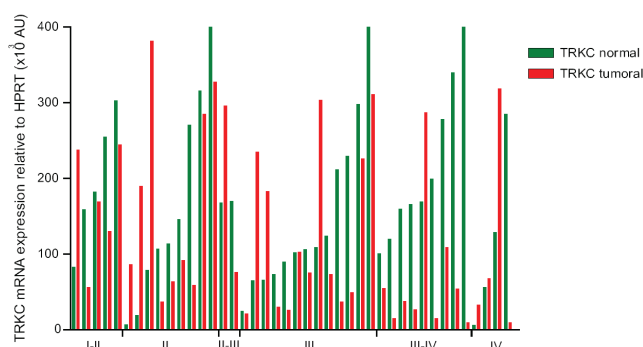
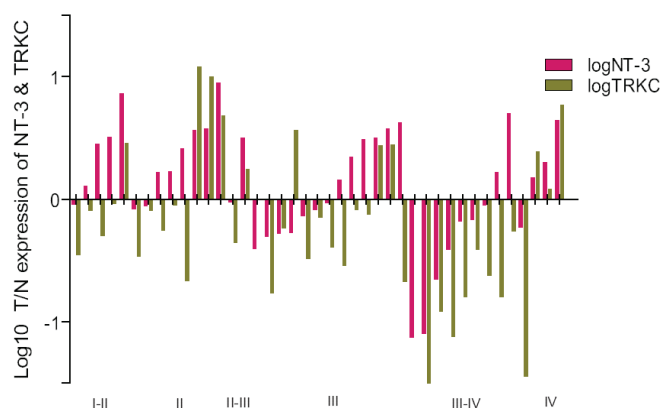


Figure 1 : Profils d'expression ARNm de *NT-3* (A) et *TrkC* (B) dans une cohorte de 45 patients atteints de cancer du rein, établis par RT-qPCR. Pour chaque patient, le résultat en vert correspond à l'expression dans le tissu normal, et en rouge dans le tissu tumoral associé. Les patients sont classés en fonction du grade tumoral. Les résultats sont présentés en unité arbitraire (AU), $\times 10^3$.

2A.



2B.

I-II/II (13)	TRKC stable/high	TRKC lost
NT-3 stable/lost	15%	23%
NT-3 gain	23%	46%

II-III/III (15)	TRKC stable/high	TRKC lost
NT-3 stable/lost	13%	40%
NT-3 gain	20%	27%

II-III/III (13)	TRKC stable/high	TRKC lost
NT-3 stable/lost	8%	54%
NT-3 gain	23%	15%

Figure 2 : **A.** Profil d'expression ARNm de *NT-3* et *TrkC* dans une cohorte de 45 patients atteints de cancer du rein, établis par q-RT-PCR. Les résultats sont présentés sous forme logarithmique, Log10 [expression tissu tumoral/expression tissu normal]. Pour chaque patient, les résultats en vert représentent *NT-3* et en rose *TrkC*. Les patients sont classés en fonction du grade tumoral. **B.** Tableau récapitulatif de l'expression de *NT-3* et *TrkC* en fonction du grade tumoral.

Indépendamment du grade tumoral, on observe dans le tissu tumoral par rapport au tissu normal une perte ou un gain de *NT-3* et/ou *TrkC* (Figure 2AB). Nous nous intéressons tout particulièrement au cas où l'expression de *TrkC* est stable, voir augmentée, et associé à un gain de *NT-3*. Cette configuration est retrouvée chez 20 à 23% des patients, selon le grade tumoral (Figure 2B).

3.

Renal cell lines	NT-3 mRNA expression relative to HPRT (x10 ³ , UA)
786-O	4,84
Met	0,56
VER	1,05
CHA	0,14
TUMT	1,54
A-704	24,69
CAKI I	0,00
CAKI II	0,31
RCC4	15,30

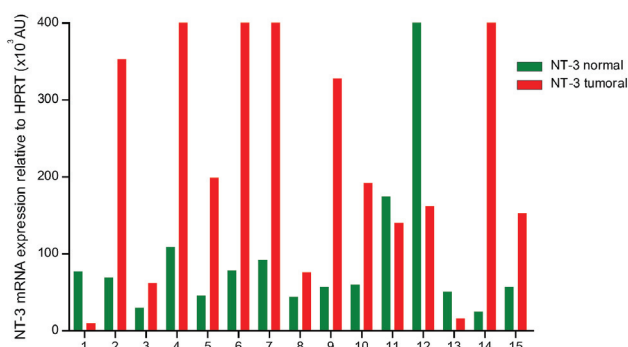
Figure 3 : Expression de *NT-3* dans des lignées cellulaires de cancer du rein, analysée par RT-qPCR. *Hprt* a été utilisé comme gène de ménage pour normaliser les résultats. Les résultats sont présentés en unité arbitraire, x10³

A la recherche d'un modèle d'étude, j'ai tout d'abord analysé l'expression de *NT-3* dans une série de lignées cellulaires de cancer du rein. Les lignées A-704 et RCC4 sont celles présentant la plus forte expression de *NT-3*, la lignée RCC4 présentant l'avantage d'être xénogreffable, et d'exprimer *TrkC* (données non montrées).

b) Cas du cancer du poumon

J'ai ensuite analysé l'expression de *NT-3* et de *TrkC*, toujours par q-RT-PCR dans une cohorte de 15 patients atteints de cancer du rein. Pour chaque patient, je disposais de tissu tumoral et du tissu normal associé (Figures 4AB).

4A.



4B.

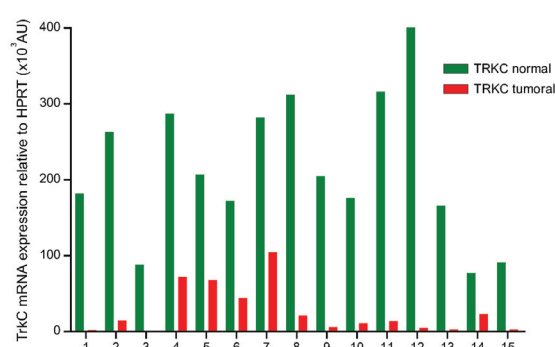


Figure4 : Profils d'expression ARNm de *NT-3* (A) et *TrkC* (B) dans une cohorte de 15 patients atteints de cancer du poumon, établis par RT-qPCR. Pour chaque patient, le résultat en vert correspond à l'expression dans le tissu normal, et en rouge dans le tissu tumoral associé. Les patients sont classés en fonction du grade tumoral. Les résultats sont présentés en unité arbitraire (AU), $\times 10^3$.

Pour l'ensemble des patients, on observe une diminution de l'expression de *TrkC* dans le tissu tumoral par rapport au tissu normal (Figure 4B), et pour une grande majorité (75%), *NT-3* est sur-exprimé dans le tissu tumoral (Figure 4A). De manière intéressante, les patients 4, 5, 6 et 7 qui sont ceux conservant l'expression de *TrkC* la plus importante, font partie des 75% sur-exprimant *Nt-3*. Autrement dit, 25% des patients continuent d'exprimer *TrkC* et sur-expriment *NT-3*.

c) Cas du cancer du sein

Dans une cohorte de 70 échantillons de cancer du sein, j'ai analysé l'expression de *NT-3* et de *TrkC* par RT-qPCR. (Figures 5). Les échantillons pouvaient être classés selon trois grades tumoraux : M0-N0, M0-N1 et M1. Cependant, je ne disposais pas de tissu sain pouvant servir de référence.

5.

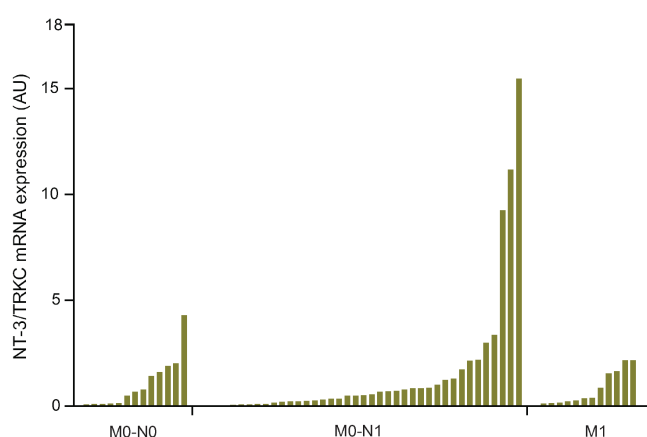


Figure 5 : Rapport du taux d'expression de *NT-3* sur le taux d'expression de *TrkC*, établis par q-RT-PCR, pour 70 patients atteints de cancer du sein allant du grade M0-N0 au grade M1. Les résultats sont présentés en unité arbitraire (AU), $\times 10^3$.

Le rapport de l'expression de *NT-3* sur *TrkC* nous permet d'évaluer les échantillons pour lesquels *NT-3* est en excès par rapport à *TRKC*. On constate que pour tous les grades tumoraux, on retrouve des échantillons avec un nombre de molécules de *NT-3* en excès par rapport à *TRKC*. Cependant, l'absence de tissu sain pour établir une comparaison ne permet pas de conclure sur ces résultats.

3.2 – Régulation de l'expression de *NT-3*

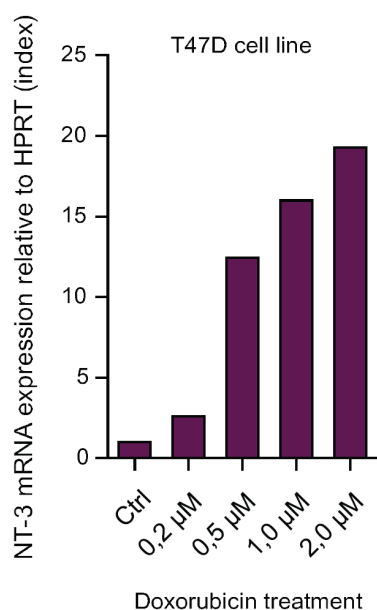
Dans le but d'étudier la possibilité d'un lien entre la chimiorésistance des tumeurs mammaires et l'établissement d'une boucle de sur-expression de *NT-3*, j'ai analysé l'expression de *NT-3* dans trois lignées de sein (Figure 6). Je les ai ensuite traitées avec différentes doses de doxorubicine afin de voir si un tel traitement pouvait avoir un effet sur l'expression de *NT-3* (Figure 7ABC).

6.

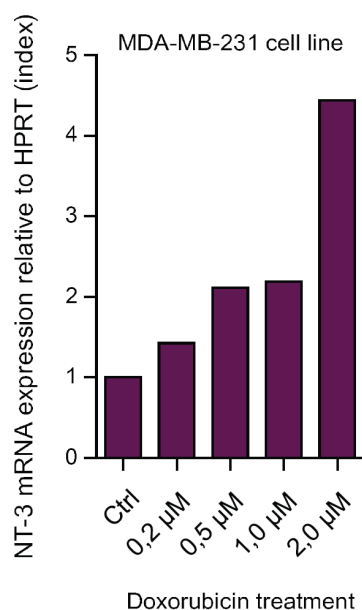
Breast cancer cell lines	NT-3 mRNA expression relative to HPRT ($\times 10^3$, AU)
T47D	0,5
MDA-MB-231	3,3
MDA-MB-436	2,4

Figure 6 : Mesure du taux d'expression de *NT-3* dans trois lignées de cancer du sein. Les résultats sont présentés en unité arbitraire (AU), $\times 10^3$.

7A.



B.



C.

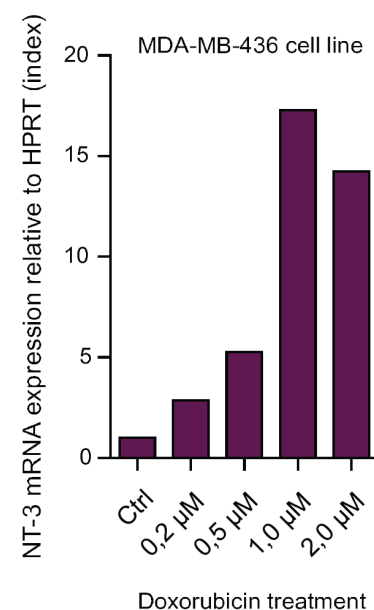


Figure 7 : Mesure du taux d'expression de *NT-3* dans trois lignées de cancer du sein après traitement avec des doses croissantes de doxorubicine. L'analyse est faite par RT-qPCR. Les cellules sont traitées pendant 48h avec 0, 0.2, 0.5, 1.0 ou 2.0 μ M de doxorubicine. Les résultats sont présentés en index par rapport au contrôle.

On remarque que les lignées MDA-MB-231 et MDA-MB-436, qui sont des lignées basales, ont un taux de *NT-3* supérieur à la lignée luminaire T47D (Figure 6). Le traitement des lignées cellulaires avec des doses croissantes de doxorubicine entraîne une augmentation de l'expression de *NT-3*, augmentation jusqu'à presque 20X dans les T47D et les MDA-MB-436 (Figure 7).

3.3 – BAF180, nouveau partenaire potentiel de TRKC KF

Parmi les nombreux partenaires potentiels de TRKC KF identifiés lors de notre crible double-hybride, je me suis intéressée à BAF180, une protéine impliquée dans le remodelage de la chromatine, identifiée comme un tumeur supprimeur potentiel dans le cancer du sein, et comme un régulateur de p53. J'ai pu confirmer l'interaction de BAF180 avec TRKC KF, par co-immunoprécipitation dans des cellules 293T (Figure 8).

8.

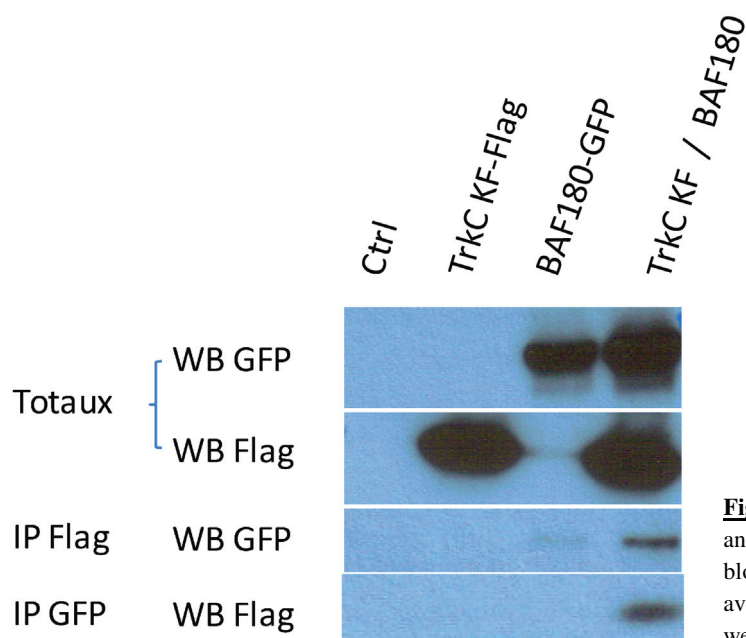


Figure 8 : Immunoprécipitation de TRKC KF avec un anticorps anti-flag, révélation de BAF180 par western blot avec un anti-GFP. Immunoprécipitation de BAF180 avec un anticorps anti-GFP, révélation de TRKC KF par western blot avec un anti-flag.

I – TRKC, un récepteur à dépendance : Quelle signification biologique ?

1 – Comment le départ du ligand NT-3 peut-il induire l'apoptose ?

La théorie des récepteurs à dépendance (RDs) implique qu'un récepteur de ce type, en l'absence de son ligand, sera capable d'induire la mort cellulaire par apoptose, et ceci de manière active, grâce à la mise en place d'une voie de signalisation négative. C'est le cas de TRKC, qui en l'absence de son ligand NT-3, entraîne l'apoptose des cellules qui l'expriment. Comment le retrait du ligand déclenche-t-il l'induction pro-apoptotique de son récepteur ? A ce jour, plusieurs hypothèses peuvent être avancées.

Une première possibilité serait que le ligand, en se détachant de son RD, induise un changement de conformation tridimensionnelle de la partie intracellulaire du récepteur, qui exposerait les sites de clivage par les caspases ; en l'occurrence D495 et D641 pour TRKC. Des résultats obtenus pour certains RD comme DCC et UNC5H2, montrent une adaptation de la conformation multimérique de la protéine en fonction de la présence ou non du ligand (Mille et al., 2009b). TRKC est un RD particulier puisque c'est aussi un récepteur à tyrosine kinase. Or, comme la plupart des récepteurs à tyrosine kinase il se dimérise quand il est activé par son ligand (Reichardt, 2006), ce qui pourrait confirmer l'hypothèse selon laquelle les sites de clivage de TRKC sont inaccessibles aux caspases en présence de NT-3. De plus, une analyse *in silico* a montré que cette dimérisation de TRKC pourrait masquer précisément les résidus aspartiques qui sont la cible des caspases (Delcros JC., données non publiées). Ainsi, le départ de NT-3 entraînerait la monomérisation de TRKC et l'exposition des résidus aspartiques ciblés par les caspases. Toujours selon l'hypothèse de la libération de l'accès aux sites de clivages, il est possible qu'une déphosphorylation du RD en soit responsable, puisque à l'inverse, une phosphorylation du RD MET sur le résidu Y1001 a été rapportée comme étant suffisante pour empêcher le clivage par les caspases (Deheuninck et al., 2009).

Une seconde explication peut être avancée, quand on sait que la fixation de NT-3 sur TRKC active une cascade de signalisation positive où entrent en jeu les voies RAS/MAPK et PI3K/AKT. On peut en effet imaginer que des voies de signalisation aussi puissantes pourraient exercer un contrôle négatif sur l'activité d'induction d'apoptose de TRKC. Ainsi le départ de NT-3 pourrait lever le rétrocontrôle négatif de ces voies positives sur la signalisation de mort induite par TRKC. Des éléments sont en faveur d'une telle hypothèse, comme le fait que la voie PI3K/AKT activée exerce déjà une action anti-apoptotique en entraînant la phosphorylation et la séquestration nucléaire de la protéine pro-apoptotique BAD. De la même manière, le facteur de

transcription FOXO3A est lui aussi inactivé, ce qui inhibe la transcription de ses cibles, en particulier les effecteurs apoptotiques FASL, TRAIL, PUMA et BID. Sachant que NT-3 active également la voie de signalisation NF- κ B, se sont autant de possibilités qu'une régulation négative s'exerce sur la fonction pro-apoptotique de TRKC en présence de son ligand (pour revue, Ichim et al., 2012).

Pour répondre à ces questions, nous avons mis en œuvre plusieurs expériences. Une première consiste à comparer l'induction de mort cellulaire par TRKC sauvage (WT) et TRKC muté au niveau de son site d'activité kinase : TRKC KD (Kinase Dead). *In vitro*, nos résultats préliminaires dans les lignées cellulaires A549 et 293T ne montrent pas de différence significative de capacité à induire l'apoptose entre TRKC WT et KD. Nous avons ensuite testé l'effet de la présence de NT-3 sur la mort induite par TRKC WT et KD. Nos résultats, trop variables, ne nous permettent pas de conclure. Cependant, des expériences réalisées *ex vivo* par l'équipe de Urmas Arumae dans des neurones invalidés pour TRKC endogène, puis transfectés avec soit TRKC WT, soit TRKC KD, en présence ou non de NT-3, tendent à montrer que en présence de TRKC KD, une part de la mort cellulaire n'est pas inhibée par NT-3, tandis que l'inhibition est plus importante pour TRKC WT. Ces résultats pourraient signifier qu'en l'absence de NT-3, une part de la mort induite par TRKC WT est due à sa signalisation pro-apoptotique, et une autre à l'absence de sa signalisation positive. Autrement dit, il semblerait donc qu'en présence de NT-3, à la fois la dimérisation et le changement de conformation du récepteur, ainsi que l'activation des voies MAPK, participent à l'inhibition de mort induite par TRKC. Cependant, ces résultats restent préliminaires, car ce modèle d'étude ne permet ni de vérifier que l'expression de TRKC WT et KD sont équivalentes, ni de vérifier que l'invalidation du récepteur endogène par siRNA (ciblant les extrémités 3'UTR) est complète.

2 – L'activation des caspases : un évènement initiateur ou exécutif ?

On sait que l'activité pro-apoptotique de la plupart des RDs dépend d'un clivage par les caspases au niveau de leur domaine intracellulaire (Goldschneider and Mehlen, 2010). Il semblerait que ce signal pro-apoptotique, une fois déclenché, soit ensuite entretenu et amplifié, soit par le RD lui-même, soit par le recrutement d'un complexe d'activation des caspases (Thibert and Fombonne, 2010).

2.1 – Le « dépendosome », une plateforme activatrice pour TRKC ?

Ce complexe d'amplification du signal apoptotique, mis en évidence par exemple dans le cas du RD PATCHED, a été appelé « le dépendosome » (Mille et al., 2009a). L'une des questions

à laquelle nous tentons de répondre actuellement concerne donc le possible recrutement d'un dépendosome par TRKC non lié. Ceci pourrait expliquer l'activation localisée de la caspase-9, et donc le double-clivage du domaine intra-cellulaire de TRKC et la libération du fragment pro-apoptotique TRKC KF. Il a été démontré qu'en l'absence de son ligand, PATCHED recrute un complexe protéique formé de DRAL, NALP1 et la caspase-9. Le dépendosome serait une plateforme pour activer la caspase-9 initiateur, qui contrôlerait ensuite l'activation des caspases effectrices en aval (Mille et al., 2009a). Il a été démontré que les caspases initiateurs sont souvent activées au sein de complexes multi-protéiques. Parmi les complexes activateurs les mieux caractérisés chez les mammifères on trouve l'apoptosome (Apaf-1, cytochrome c, pro-caspase-9), le complexe DISC (FAS, FADD, caspase-8), le PIDDosome (PIDD, RAIDD, caspase-2) et l'inflammasome (NALP1, ASC, caspase-1 and -5) (Park, 2012).

Nos résultats préliminaires montrent que suite à une déprivation en NT-3, TRKC recrute tous les composants du dépendosome, responsable de l'activation des caspases -9 et -3 (données non publiées). L'extinction de l'expression de DRAL ou NALP1 inhibe l'induction d'apoptose par TRKC, à la fois *in vitro* et *in vivo*, dans un modèle de tumorigenèse chez le poulet. De manière intéressante, NALP1 a été décrit comme capable d'induire l'apoptose, soit en association directe avec les caspases -2 et -9, soit indirectement, en interagissant avec APAF-1 et en amplifiant l'activité de l'apoptosome (Tschopp et al., 2003). De plus, une étude préliminaire décrit l'interaction entre PATCHED et l'ubiquitine ligase XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis), qui pourrait être un autre composant du dépendosome. Sachant que l'ubiquitination de la caspase-9 par XIAP entraîne sa dégradation, il serait intéressant de regarder si XIAP exerce un contrôle sur la caspase-9 activée au sein du dépendosome, assurant ainsi une activation caspase localisée, responsable du clivage du RD. Enfin, la taille importante du dépendosome (1000-2000 kDa) suggère l'existence d'autres composants qui pourraient eux aussi être impliqués dans l'apoptose induite par TRKC, et qu'il serait intéressant d'identifier et d'investiguer.

Néanmoins, des travaux supplémentaires sont nécessaires pour résoudre ces questions. Une approche cristallographique et biochimique pourrait être bénéfique pour améliorer la compréhension de l'enchaînement des événements en amont du signal apoptotique, en particulier la formation du dépendosome.

2.2 – L'hypothèse d'une activation locale des caspases

Une question commune à l'étude de chacun des RD demeure : comment le clivage des RDs par les caspases pourrait être un événement initiateur de la cascade pro-apoptotique, sachant que l'activation des caspases est connue pour être un événement terminal de la signalisation de mort cellulaire ? Face à ce paradoxe, nous pouvons émettre plusieurs hypothèses susceptibles de le résoudre.

Une première explication réside dans la possibilité que les pro-caspases ne soient pas totalement inactives, et puissent avoir une activité protéolytique basale à proximité de leur substrat, ce qui pourrait être suffisant pour initier le signal apoptotique (Yang et al., 1998). De plus, on sait que les substrats des caspases sont aussi multiples et différents que peuvent l'être les cytokines, les kinases, les polymérases, et même les facteurs de transcription, et qu'ils ne sont pas tous impliqués dans la voie apoptotique (Lamkanfi et al., 2007). C'est pourquoi l'activité protéolytique des caspases est fortement régulée, en particulier par des inhibiteurs endogènes des caspases comme les protéines IAPs, qui limitent la propagation de l'activation des caspases (Salvesen and Duckett, 2002). Nous pouvons donc imaginer que l'induction d'apoptose par les RD pourrait trouver son origine dans un phénomène très localisé, le clivage du domaine intracellulaire du récepteur, qui engendrerait ensuite une amplification du signal d'apoptose, et se propagerait aux récepteurs et aux caspases environnants, pour finalement entraîner la mort de la cellule. Un tel phénomène pourrait être favorisé par un contexte cellulaire particulier, créé par l'absence du ligand du RD. Dans le cas de TRKC, nous pouvons penser qu'une restriction de la disponibilité environnementale de son ligand NT-3, pourrait permettre aux caspases l'accès aux sites de clivage, et il n'est pas impossible que la disparition de la voie kinase positive de TRKC ait un impact sur le stress cellulaire. Ainsi l'absence de NT-3 elle-même pourrait créer un contexte favorable à la survenue et à l'amplification du signal apoptotique, au départ localisé.

D'autre part, de plus en plus d'éléments suggèrent que certains RDs, en l'absence de leur ligand, pourraient recruter un complexe protéique qui serait responsable de leur propre clivage par les caspases, exposant ou libérant ainsi un domaine apoptotique initiateur de la cascade de mort cellulaire. De même que pour le RD PATCHED, des résultats préliminaires indiquent que TRKC serait capable de recruter la protéine adaptatrice DRAL (Down-regulated in Rhabdomyosarcoma LIM-domain protein; also known as FLH2), NALP1, une protéine possédant un domaine CARD de recrutement des caspases (NLR family, pyrin domain containing 1), et la caspase-9. Ces protéines formeraient le « dépendosome », qui comme cela a été montré pour PATCHED, seraient capables d'activer localement la caspase-9, qui cliverait alors le domaine intracellulaire de TRKC et libèrerait ainsi TRKC KF (Giraud L. & Ichim G., données non publiées). De plus, dans le cas du RD MET, le récepteur tronqué pourrait amplifier le signal apoptotique en titrant le ligand environnant (Deheuninck et al., 2009). Il est facile d'imaginer qu'un récepteur TRKC dépourvu de son domaine intra-cellulaire, de la même manière que RET, serait capable d'amplifier le signal apoptotique.

3 – TRKC, un inducteur de la mort cellulaire intrinsèque

3.1 – La voie mitochondriale : une voie possible d'induction de mort pour les RDs ?

Au cours de ma thèse, j'ai eu l'opportunité de participer à un projet ayant pour but d'élucider l'enchaînement des événements par lesquels TRKC induit la mort cellulaire par apoptose en l'absence de NT-3. Ainsi, nous avons montré que le fragment TRKC KF généré lors du clivage du domaine intracellulaire de TRKC par les caspases au niveau des résidus aspartique D495 et D641 est partiellement adressé à la mitochondrie, où il se lie et active BAX. Ceci conduit au relargage de plusieurs protéines cytotoxiques de l'espace inter-membranaire mitochondrial, tel que le cytochrome c et Omi. S'ensuit la formation de l'apoptosome, qui activerait la caspase-9, qui à son tour activerait la caspase-3 exécutrice (Ichim et al., 2013).

Ce n'est pas la première fois qu'un tel mécanisme est décrit, à savoir le clivage d'une protéine par les caspases, donnant lieu à la libération d'un fragment pro-apoptotique dirigé à la mitochondrie. C'est le cas entre autres pour BAD, MCL-1 (Condorelli et al., 2001; Weng et al., 2005), et de manière intéressante pour un autre récepteur à tyrosine kinase, HER2. Le clivage de HER2 par les caspases libère deux fragments BAD-like, qui sont localisés à la mitochondrie et induisent le relargage du cytochrome c (Strohecker et al., 2008).

Ainsi, TRKC induirait l'apoptose en activant la voie de mort intrinsèque (mitochondriale). Or TRKC n'est peut-être pas le seul RD à agir de la sorte. En effet, il existe maintenant plusieurs évidences montrant que d'autres RDs induiraient la mort cellulaire de cette manière. Une étude similaire à la nôtre a été menée par l'équipe de David Tulasne concernant le RD MET, un autre récepteur à tyrosine kinase. Elle montre que le fragment libéré par le clivage de MET est adressé à la mitochondrie où il pourrait interagir avec BCL2, ce qui expliquerait l'induction la perméabilisation de la mitochondrie et le relargage du cytochrome c ((Lefebvre et al., 2013)). Des résultats préliminaires concernant le RD PATCHED semblent eux-aussi indiquer que sa voie de signalisation négative passerait par la mitochondrie, puisque l'apoptose induite par PATCHED est à la fois bloquée par BCL2, et par l'absence de BAK et BAX (Bonnet M. et Fombonne J., données non publiées).

Des études *in vivo* tendent à renforcer la possibilité d'un cross-talk entre le RD TRKC et l'apoptose mitochondriale. Il a par exemple été montré que la perte des neurones proprioceptifs exprimant *TrkC* dans les souris invalidées pour NT-3, est sauvée par la délétion de Bax (Patel et al., 2003). Il est intéressant de noter que la même observation a été faite concernant le RD *TrkA* (Patel et al., 2000). Enfin, les souris déficientes pour BAX présente une augmentation du nombre de neurones exprimant TRKC, ce qui suggère une implication de BAX dans la mort induite par TRKC (Suzuki et al., 2010). Cependant, même si ces études mettent en évidence un rôle de la voie mitochondriale dans la mort des neurones exprimant TRKC, une part importante de cette apoptose est due à la limitation de la disponibilité en NT-3, décrite par la théorie neurotrophique. Nous

pensons néanmoins qu'une partie de l'apoptose est initiée par TRKC lui-même, et que croiser les souris KO citées précédemment, avec une souris possédant une version de TRKC non clivable permettrait de définir le rôle de TRKC en tant que récepteur à dépendance dans la mise en place des neurones sensoriels.

3.2 – Quel rôle de TRKC KF dans cette voie de mort intrinsèque ?

L'apoptose mitochondriale est contrôlée en grande partie par les interactions des membres de la famille BCL-2 avec différentes protéines pro-apoptotiques. En particulier, BAX et BAK sont les deux protéines effectrices qui vont rompre l'intégrité de la membrane mitochondriale externe et déclencher la MOMP (Walensky & Gavathiotis, 2011). L'activation de BAX et BAK dépend principalement des protéines possédant un domaine BH3 BID et BIM, mais pas seulement. En effet, d'autres protéines capables de les activer et ne possédant pas toujours de domaine BH3, ont récemment été décrites, tels que ERBB4/HER4 et même le facteur de transcription IRF-3 (Chattopadhyay et al., 2010; Naresh et al., 2006).

Nos travaux sur la signalisation négative de TRKC ont montré que TRKC KF, qui ne possède pas de domaine BH3 fonctionnel, interagit avec BAX et l'active. Bien que nous ayons des preuves de cette interaction, il reste encore à déterminer les caractéristiques structurales et tridimensionnelles du complexe ainsi formé. D'autres questions doivent être investiguées : Où survient cette interaction, dans le cytoplasme ou à la membrane mitochondriale ? Comment TRKC KF active-t-il BAX ? TRKC KF intervient-il dans l'équilibre des relations entre BAX et les autres membres de la famille BCL-2 ? A ce stade, plusieurs scénarios restent possibles : une interaction de TRKC KF avec BAX dans le cytosol suggèrerait un rôle de TRKC KF dans le recrutement de BAX à la mitochondrie ; tandis qu'une survenue de l'interaction de nos deux protéines d'intérêt à la membrane mitochondriale, nous permettrait d'envisager un rôle de TRKC KF dans la capacité de BAX à dimériser et former les pores, par lesquels vont s'échapper les molécules toxiques de l'IMS. Des expériences supplémentaires sont nécessaires répondre sur ces points, il serait notamment intéressant d'établir la cinétique de cette interaction.

4 - Nouveaux partenaires et autres rôles potentiels de TRKC KF

Bien que nous ayons mis en lumière l'implication de COBRA1 dans la mort cellulaire induite par TRKC *via* la voie mitochondriale, améliorer la caractérisation de cette signalisation négative reste l'un de nos objectifs. Dans le but d'identifier de nouveaux partenaires pro-apoptotiques de TRKC, qui pourraient jouer un rôle dans l'induction de la mort cellulaire en l'absence de NT-3, nous avons réalisé un crible double-hybride en utilisant TRKC KF en tant

qu'appât, et une librairie d'ADNc, issus de cerveaux embryonnaires de souris (TRKC ayant été décrit pour son implication dans le développement du système nerveux), en tant que proie. Un certain nombre de partenaires potentiels de TRKC KF ont ainsi été mis en évidence, dont la majorité était nucléaire.

Notre étude sur le partenaire de TRKC, COBRA1, et son implication dans la mort cellulaire *via* la voie mitochondriale, a montré qu'une partie du fragment de clivage TRKC KF se localise à la mitochondrie. Mais elle montre aussi que tandis qu'une part de TRKC KF est localisée dans le cytoplasme, et une autre est observable dans le noyau. Nous pouvons alors imaginer d'autres rôles potentiels de TRKC KF dans le noyau, du fait de son interaction avec les partenaires décrits ci-dessous, identifiés lors de notre crible double-hybride.

4.1 – HEY1

HEY1 est un facteur de transcription appartenant à la super-famille des répresseurs transcriptionnels basique-hélice-boucle-hélice-Orange (bHLH-O), de même que HEY2 et HEYL (Davis & Turner, 2001). Il a été montré que la voie NOTCH augmentait l'expression de HEY1, ce qui conduit à l'inhibition transcriptionnelle de ses cibles. De plus, HEY1 semble être un effecteur essentiel de la voie NOTCH, de par son implication dans le développement cardiaque et vasculaire (Fischer et al., 2004), en neurogenèse (Sakamoto et al., 2003) et dans le développement du squelette (Zamurovic et al., 2004).

De manière intéressante, une analyse globale du génome a montré que HEY1 était un régulateur positif du suppresseur de tumeur p53. Forcer l'expression de HEY1 active P53 et induit l'apoptose *in vitro*, en inhibant MDM2 et en stabilisant P53 (Huang et al., 2004). Une étude récente permet d'évoquer un lien entre HEY1 et la voie pro-apoptotique de TRKC : en effet, l'invalidation de HEY1 entraînerait une augmentation du nombre de neurones exprimant *TrkC* dans les DRGs (Mukhopadhyay et al., 2009).

Des expériences préliminaires de co-immunoprécipitation et de fractionnement sub-cellulaire menées au laboratoire ont mis en évidence une interaction entre HEY1 et TRKC KF, et une translocation de TRKC KF dans le noyau suite à cette interaction. Cependant, il reste à déterminer si HEY1 est un partenaire pro- ou anti-apoptotique de TRKC. TRKC KF pourrait par exemple favoriser la régulation positive de HEY1 sur p53, ce qui augmenterait la mort cellulaire. Mais on peut aussi imaginer qu'en liant TRKC KF, HEY1 le piège dans le noyau et protège ainsi la cellule de l'apoptose induite par TRKC KF. Un tel phénomène a déjà été démontré à plusieurs reprises, c'est par exemple le cas de la protéine oncogénique C-MYC, séquestrée dans le noyau cellulaire puis détruite par le protéasome (Arabi, 2003).

4.2 – L'importine $\alpha 3$

Les importines α et β sont responsables de l'import nucléaire de centaines de protéines. L'importine $\alpha 3$ reconnaît le signal classique NLS de localisation nucléaire porté par les protéines. Ce signal correspond à une séquence de 8 à 10 acides aminés, qui varie d'une protéine nucléaire à l'autre, mais est toujours riche en acides aminés chargés positivement, c'est à dire les acides aminés basiques : arginine, lysine, histidine. L'importine $\alpha 3$ va donc lier les protéines *via* leur NLS, puis interagir avec les importines β , qui vont transporter le complexe ainsi formé à travers les pores nucléaires (Nuclear-Pore Complex, NPC) vers le noyau cellulaire. Les importines sont ensuite recyclées dans le cytoplasme par les exportines (Goldfarb et al., 2004). L'utilisation de logiciel de prédiction (http://nls-mapper.iab.keio.ac.jp/cgi-bin/NLS_Mapper_form.cgi) nous indique que TRKC KF ne possède pas de *bona fide* NLS, il ne peut donc pas être une cible directe des importines. Cependant il est possible que ce soit le complexe TRKC KF-HEY1 qui soit transporté dans le noyau par les importines. Une invalidation de l'importine $\alpha 3$ endogène pourrait nous fournir une première indication du rôle de ce partenaire potentiel de TRKC KF dans l'apoptose induite par ce RD.

4.3 - BAF180

BAF180 (PBRM1) est une sous-unité de PBAF (Polybromo/Brg1-Associated Factor), un complexe de remodelage de la chromatine essentiel dans les processus de transcription, de réplication, de réparation et de recombinaison de l'ADN (Vignali et al., 2000). Récemment, des mutations de BAF180 ont été identifiées pour un pourcentage élevé de cancer du rein (Varela et al., 2011) ; BAF180 a également été mis en avant lors d'un screen à la recherche de gènes suppresseurs de tumeurs dans le cancer du sein (Xia et al., 2008). BAF180 est aussi crucial pour la prévention des défauts de sénescence, depuis qu'il a été montré que son altération promeut la prolifération (Burrows et al., 2010). Le mécanisme par lequel BAF180 exerce son action de tumeur suppresseur semble impliquer p21 et p53 qu'il régule (Burrows et al., 2010; Xia et al., 2008).

Nos résultats préliminaires montrent qu'il existe une interaction entre TRKC KF et BAF180, et que celle-ci a lieu dans le noyau. Nous avons également tenté de regarder l'effet de TRKC KF sur la régulation transcriptionnelle de p21. Nous pouvons spéculer sur la formation d'un complexe TRKC KF – BAF180 dans le noyau, qui pourrait amplifier l'effet de BAF180 sur la régulation transcriptionnelle de p53, qui pourrait à son tour activer des inducteurs de la voie de mort intrinsèque comme BAX, PUMA ou APAF-1 (Yoshida and Miki, 2010).

II - Surexpression de *NT-3* : un mécanisme tumoral pour échapper à l'apoptose induite par TRKC ?

Depuis un certain nombre d'années déjà, et à plusieurs reprises, il a été mis en évidence au laboratoire qu'une cellule tumorale pouvait échapper à la mort cellulaire induite par un RD en surexprimant son ligand. L'existence de ce mécanisme en cancérogenèse a d'abord été démontrée dans le cas du contrôle exercé par la nétrine-1, le ligand des RD DCC et UNC5H, sur la tumorignèse colorectale, en contrôlant la mort cellulaire. Une sur-expression de la nétrine-1 a ensuite été mise en évidence dans plusieurs types de cancer : dans les cancers du sein métastatiques (Fitamant et al., 2008), le cancer du poumon (Delloye-Bourgeois et al., 2009a), les neuroblastomes agressifs (Delloye-Bourgeois et al., 2009b), et plus récemment dans les maladies inflammatoires de Bowel, qui sont un terrain plus que propice au développement d'un cancer colorectal.

L'expression de TRKC et de son ligand NT-3 a été analysée dans de nombreux types de cancer, bien que la majorité des études se soient focalisées sur TRKC. Ceci peut s'expliquer par le fait que TRKC, en tant que Récepteur à Tyrosine Kinase (RTK), est traditionnellement considéré comme un oncogène favorisant le développement tumoral quand il est anormalement activé. Ce point de vue est vérifié dans de nombreux cancers, cependant, le rôle de TRKC est moins évident dans les tumeurs où sa présence a été montrée comme étant un marqueur de bon pronostic (Nakagawara, 2001; Svensson et al., 1997). Jusqu'ici, NT-3 a surtout été considéré comme le ligand du récepteur oncogénique TRKC, permettant son activation de manière constitutive. Or au laboratoire, nous considérons le couple TRKC/NT-3 sous l'angle des Récepteurs à Dépendance, ce qui nous amène à nuancer l'interprétation des résultats sur l'expression de TRKC et NT-3 dans les tumeurs.

1 – La sur-expression de *NT-3*, un blocage direct de la voie négative de TRKC : l'exemple du neuroblastome et du cancer du rein

Au cours de ma thèse, j'ai donc appréhendé TRKC du point de vue des récepteurs à dépendance (RD). Or si nous reconsidérons le couple TRKC/NT-3 à travers le filtre de la théorie des RDs, nous pouvons argumenter que la surexpression de *NT-3* peut entraîner la survie cellulaire en activant la cascade de signalisation positive des RTKs, mais aussi en inhibant l'apoptose induite par TRKC. Nous pouvons donc établir que la surexpression de *NT-3* confère un avantage sélectif aux cellules tumorales, ce qui a été démontré par mon équipe dans le cas du neuroblastome (Bouzas-rodriguez et al., 2010). En effet, nous avons montré que l'augmentation de l'expression de *NT-3* dans une large part des neuroblastomes agressifs de stade 4, bloque l'apoptose induite par TRKC, et favorise la survie et la dissémination des cellules cancéreuses (Bouzas-rodriguez et al., 2010).

J'ai donc cherché, au cours de ma thèse, à étendre à d'autres types de cancer cette preuve de concept établie dans le neuroblastome pour NT-3 et TRKC.

Lors de l'établissement de profils d'expression de *TrkC* et *NT-3*, j'ai obtenu des résultats préliminaires intéressants concernant le cancer du rein. En effet, j'ai observé d'importantes variations de l'expression de *TrkC* et *NT-3* entre le tissu normal et le tissu tumoral associé. Il existe dans les tumeurs rénales des pertes de NT-3, des pertes de TRKC, des pertes de NT-3 et TRKC, ou encore des sur-expressions de *NT-3*. De manière intéressante, j'ai pu établir que selon le grade tumoral, de 20 à 23% des patients, tandis qu'ils continuent d'exprimer *TrkC*, sur-expriment *NT-3* dans le tissu cancéreux par rapport au tissu normal associé. Or c'est cette configuration particulière qui nous intéresse, car comme cela a été montré dans le cas neuroblastome, cette boucle autocrine de production de NT-3 pourrait être ciblée par des agents interférant afin de bloquer la liaison de NT-3 avec TRKC, et induire l'apoptose des cellules cancéreuses (Genevois AL., données non publiées). De premières analyses de l'expression de *TrkC* et *NT-3* dans des échantillons d'une cohorte de patients atteints de cancer du poumon, laissent entrevoir qu'un pourcentage non négligeable (25%) de ces patients pourraient eux aussi présenter une sur-expression de *NT-3* associée à la présence de TRKC. Ces résultats, que ce soit pour le cancer du rein ou pour le cancer du poumon, ayant été obtenus par une analyse d'expression au niveau ARNm, doivent être confirmés au niveau protéique par des marquages immuno-histochimiques, par exemple des TMA.

2 – La régulation de l'expression de *NT-3* : quels mécanismes ?

Nous avons démontré que la sur-expression de *NT-3* dans les cellules tumorales leur confère un avantage sélectif en favorisant leur survie. Mais par quel mécanisme cette boucle d'auto-production de NT-3 se met-elle en place ?

L'impact du phénomène d'hyperméthylation dans le développement tumoral, souvent décrit, est principalement dû à l'extinction de l'expression des gènes suppresseurs qu'elle entraîne. A l'inverse, la relevance physiologique de l'hypométhylation de l'ADN est moins bien connue (Ehrlich, 2002), même s'il a été montré que l'hypométhylation de plusieurs gènes associés au développement cancéreux donnait lieu à une expression génique aberrante. C'est le cas par exemple de la protéine de jonction claudine-4, dont l'expression est augmentée de manière aberrante dans les cancers gastriques (Kwon et al., 2011).

L'augmentation de NT-3 dans les cancers pourrait également être due à une dérégulation par les facteurs de transcription. En utilisant des logiciels de prédiction pour les sites de fixation des facteurs de transcription (<http://www.phylofoot.org/consite/>; <http://www.cbrc.jp/htbin/nph-tfsearch>), nous avons pu déterminer de potentiels sites de fixation pour des facteurs de transcription tels que ZEB-2, NF-κB et HSF1 (Heat Shock Factor 1) sur la région promotrice de

NT-3. ZEB-2 est l'un des facteurs de transcription impliqué dans une étape clé du développement embryologique et de l'évolution tumorale : la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT). Lors de l'EMT, les cellules cancéreuses acquièrent des caractéristiques propres aux cellules souches, ce qui augmente leur capacité à envahir le tissu environnant et à résister aux traitements de chimiothérapie (Polyak 2009). Un sous-type des tumeurs du sein triple négatives, les tumeurs claudin-low, présente un enrichissement en marqueurs de transition EMT et en propriétés de cellules souches. De manière intéressante, j'ai observé une augmentation de l'expression de *NT-3* dans plusieurs lignées cellulaires de cancer du sein claudin-low telles que les MDA-MB-231, MDA-MB-436 et les HS578T, tandis que dans la lignée ductale T47D, aucune sur-expression de *NT-3* n'est détectée. Nous pouvons imaginer que la dérégulation transcriptionnelle de l'expression de *NT-3* dans les tumeurs du sein claudin-low pourrait être due à des facteurs de transcription impliqué dans l'EMT, comme ZEB-2 mais aussi SNAI1, SLUG ou TWIST1.

Le facteur de transcription NF- κ B a récemment été associé avec une augmentation de l'expression de sa cible transcriptionnelle la nétrine-1, dans une fraction de tumeurs colorectales issues de patients souffrant d'une inflammation chronique de l'intestin, la maladie de Bowel (Inflammatory Bowel Disease : IBD). Il a également été proposé que l'induction de l'expression de la nétrine-1 par NF- κ B puisse affecter la progression tumorale colorectale (Paradisi et al., 2013), en bloquant la mort cellulaire induite par les récepteurs à dépendance liant la nétrine-1 : DCC et UNC5H. Un mécanisme similaire pourrait s'appliquer à la régulation de l'expression de *NT-3*. Il faudrait détecter la présence de marqueurs de l'inflammation et éventuellement la corrélérer avec l'expression de *NT-3* dans les différents cancers montrant une surexpression de *NT-3*.

C'est lors d'une étude globale du génome que la possibilité d'une régulation de l'expression de *NT-3* par HSF1 a vu le jour. En effet, *NT-3* a été identifié comme étant un des gènes pouvant être régulé par HSF1, que ce soit de manière directe ou indirecte (Page, 2006). HSF1 est le principal régulateur transcriptionnel des protéines de stress, les Heat Shock Proteins (HSPs), qui sont produites en réponse à des éléments de stress protéo-toxique tels que les chocs thermiques, l'hypoxie, la présence de radicaux libres ou encore une déprivation en ATP. Les HSPs vont soit favoriser la re-conformation des protéines présentant des défauts d'assemblage, soit les diriger vers le protéasome pour être détruites quand la correction n'est plus une option possible. (Whitesell 2005). Alors que l'on sait que la production d'HSPs augmente dans une grande majorité des cancers, peu de choses sont connues sur le rôle de HSF1 dans le développement tumoral. Cependant, on peut penser que les cellules cancéreuses étant soumises à de nombreux stress auxquels elles doivent résister, il est possible que HSF1 stimule l'expression de ses cibles transcriptionnelles, dont font partie les HSPs, afin de faciliter l'adaptation cellulaire aux conditions tumorales.

Cette adaptation pourrait également donné lieu à une sur-expression de *NT-3* par HSF1, qui favoriserait la survie des cellules cancéreuses en activant la fonction tyrosine kinase de son récepteur TRKC, et en les protégeant de la mort induite par l'activité récepteur à dépendance de TRKC.

3- Cibler l'interaction NT-3/TRKC : une nouvelle cible thérapeutique

Depuis la première description de l'implication des récepteurs à tyrosine kinase en cancérogenèse, des molécules thérapeutiques ont été développées pour inhiber l'activité kinase des protéines TRKs. Les plus connues, CEP-701, CEP-2563 ou CEP-751 (lestaurtinib) sont des inhibiteurs de l'activité tyrosine kinase, présentant une homologie de structure avec la staurosporine, le précurseur des inhibiteurs modernes, et qui entrent en compétition avec les récepteurs TRKs pour la fixation de l'ATP. Ces inhibiteurs sont actuellement en essais cliniques de phase I et II, et leur efficacité a déjà été établie pour de nombreux types de cancers. Cependant, ces inhibiteurs doivent surmonter deux problèmes principaux : tout d'abord, du fait du degré d'homologie élevé des domaines kinase de TRKA, B et C, ces inhibiteurs ne sont pour l'instant pas capables de fixer un récepteur TRK de manière spécifique ; deuxièmement, les mutations survenant au niveau du domaine kinase confèrent aux cellules cancéreuses une résistance à ces inhibiteurs (pour revue, Tauszig-Delamasure and Bouzas-Rodriguez, 2011).

L'étude menée au laboratoire sur le neuroblastome propose une alternative aux inhibiteurs de l'activité tyrosine kinase. Nous proposons de développer des agents capables d'interférer dans l'interaction TRKC/NT-3, une stratégie qui pourrait être utilisée en synergie avec les inhibiteurs des TRKs déjà existants. Ceci serait valable pour les patients dont la tumeur sur-exprimerait NT-3. Un des objectifs des prochaines études au laboratoire sera donc de cibler spécifiquement l'interaction entre TRKC et NT-3. Sachant que les domaines extracellulaires des récepteurs TRKs présentent une faible homologie de séquence, un agent interférant qui ciblerait le domaine extracellulaire des TRKs gagnerait en spécificité.

La preuve de concept a été établie avec un anticorps polyclonal bloquant l'interaction TRKC/NT-3, et la start-up Nétris-Pharma, qui évolue en étroite collaboration avec notre équipe de recherche, travaille actuellement au développement d'un anticorps monoclonal qui serait spécifique de TRKC. Une autre stratégie envisagée par Nétris-pharma serait d'utiliser des peptides synthétiques mimant le domaine d'interaction de TRKC avec NT-3. Plusieurs modifications chimiques seraient requises afin d'améliorer leurs propriétés pharmaco-cinétiques. Un crible virtuel réalisé par D. Rognan a aussi été réalisé, afin d'identifier, dans une banque de molécules chimiques déjà existantes, lesquelles seraient susceptibles de bloquer l'interaction de NT-3 avec TRKC. 80 molécules ont été identifiées et doivent encore être testées. Il sera important de mesurer la toxicité propre à chacune. Pour tester tous ces agents thérapeutiques potentiels, nous allons avoir besoin d'un modèle d'étude. Nous sommes donc à la recherche d'une lignée cellulaire cancéreuse, sur-exprimant NT-3, exprimant TRKC, et xénogreffable chez la souris, afin de pouvoir passer d'un modèle *in vitro* à une démonstration *in vivo*, si un agent potentiel démontre des effets robustes *in vitro*. La lignée de cancer du rein RCC4 semblait rassembler tous nos critères, mais il s'est finalement avéré que les greffes chez la souris ne prenaient pas. Nétris-pharma poursuit donc activement la recherche d'un modèle qui permettrait de tester entre autre les 80 molécules issues du crible virtuel.

Enfin, il sera important d'investiguer les possibles effets secondaires d'une telle stratégie thérapeutique, étant donné l'implication de NT-3 dans le développement cardiaque, et son rôle dans la vascularisation des muscles lisses chez l'adulte (Donovan et al., 1995; Hiltunen et al., 1996).

III – TRKC, un suppresseur de tumeurs conditionnel ?

Une première stratégie, décrite précédemment, pour échapper à l'apoptose induite par un RD, est la sur-expression du ligand par la cellule. Une seconde, également mise en évidence au laboratoire, est l'inactivation du RD lui-même, afin qu'il ne puisse plus induire l'apoptose. Ce mécanisme a été montré pour le cadre du RD UNC5C dans le cancer colorectal (Bernet et al., 2008), et plus récemment et très élégamment pour DCC, toujours dans le cancer colorectal (Castets et al., 2012).

Une inactivation de TRKC pourrait donc elle aussi être considérée comme une stratégie oncogénique qui permettrait aux cellules cancéreuses d'échapper à l'apoptose induite par TRKC. Ce fût d'ailleurs le principal sujet d'étude de ma thèse, que nous avons récemment publié, et dans lequel nous décrivons ce mécanisme impliqué dans le cancer colorectal (Genevois et al., 2013).

1 – Inhibition de l'expression de *TrkC* dans le cancer du colon

Nous avons analysé l'expression de *TrkC* et *NT-3* dans un panel de 45 patients atteints de cancer du colon. Menées au niveau ARNm et confirmées au niveau protéique, ces analyses ont montré chez 93% des patients, une diminution massive de l'expression de *TrkC* dans le tissu tumoral par rapport au tissu normal associé. Plus précisément, l'expression de *TrkC* est diminuée jusqu'à 10X dans plus de 60% des tumeurs, et jusqu'à 50X dans un tiers des tumeurs testées. Cependant, cette diminution de l'expression de *TrkC* apparaît indépendante du grade tumoral, et ne peut donc pas constituer un marqueur d'évolution tumorale. L'expression de *NT-3* quant à elle ne présente aucune variation significative dans les tumeurs colorectales. Ainsi, on peut considérer que tandis que dans le cas du neuroblastome, la sur-expression de NT-3 qui confère un avantage sélectif aux cellules tumorales, dans le cancer du colon, c'est la perte d'expression de *TrkC* qui confère un avantage de survie aux cellules.

Nous avons ensuite analysé l'expression de *TrkC* dans une quinzaine de lignées cellulaires de cancer colorectal. La plupart d'entre elles présentaient une expression de *TrkC* inexistante ou faible, comparée à celle dans les lignées IMR32 et CLB-Ge2 de neuroblastome. Les lignées HCT8 et HCT116, pour lesquelles nous avons confirmé par immuno-histochimie l'absence de NT-3, nous ont servi de modèle *in vitro* pour notre étude.

2 – *TrkC*, victime de la régulation épigénétique

2.1 – Une hyperméthylation du promoteur et une perte de l'expression de *TrkC*

Ayant observé cette perte de *TrkC* dans le cancer colorectal, nous nous sommes interrogés sur le mécanisme responsable d'une telle inhibition de son expression. Les travaux menés au laboratoire pour UNC5C et DCC ont mis en évidence deux possibilités pouvant donner lieu à une perte d'expression génique du RD. Dans les cancers colorectaux, l'expression du RD DCC est majoritairement perdue par perte d'hétérozygotie (LOH) (Fearon et al., 1990). Concernant UNC5C, une hyperméthylation du promoteur du gène est responsable de son inactivation dans une grande majorité des cas (78%), tandis qu'une perte d'hétérozygotie (LOH) survient dans une minorité (22%) (Bernet et al., 2008).

Dans le cadre de notre étude, nous observions une perte de l'expression de TRKC dans le cancer colorectal. Pour identifier les mécanismes responsables de cette perte d'expression de *TrkC*, nous avons tout d'abord vérifié la possibilité d'une perte d'hétérozygotie au niveau du locus de TRKC, comme c'est le cas pour le RD DCC, et en partie pour UNC5C dont les expressions sont elles-aussi inhibées dans les cancers du colon. Nous avons donc utilisé l'analyse micro-satellitaire pour détecter d'éventuelles délétions dans la séquence de *TrkC*, mais nous n'avons observé aucune perte d'hétérozygotie.

En parallèle, nous avons testé l'hypothèse d'une dérégulation de la transcription de *TrkC*, bien que ce mécanisme n'ait pas été démontré dans le cadre des RDs. On sait peu de choses concernant la régulation de l'expression de *TrkC*. Il y a une dizaine d'années, deux études sur le développement, la survie, et la projection des neurones proprioceptifs (exprimant *TrkC*) ont suggéré un rôle du facteur de transcription RUNX3 dans la régulation de l'expression de *TrkC* (Inoue et al., 2002; Levanon et al., 2002). Plus récemment, une étude a démontré la régulation positive de TRKC par le facteur de transcription SOX2 dans des cellules souches embryonnaires humaines (hES) (Fong et al., 2012). SOX2 est un facteur de transcription impliqué dans le développement embryonnaire, et essentiel à l'auto-renouvellement des cellules souches. Pour vérifier que la perte de l'expression de *TrkC* dans le cancer colorectal n'était pas due à une dérégulation transcriptionnelle, nous avons donc testé l'activité de son promoteur dans une lignée de sein exprimant *TrkC*, et dans une lignée de colon n'exprimant pas *TrkC*. L'absence de différence dans l'activation d'un gène rapporteur luciférase, placé sous le contrôle du promoteur de *TrkC*, et transfecté dans des cellules négative ou positive pour TRKC, nous a permis d'éliminer la possibilité d'une modulation indirecte des régulateurs de la transcription de *TrkC*.

Enfin, nous avons testé la possibilité d'une régulation épigénétique de l'expression de *TrkC*, sachant que c'est la cause de la majorité de la perte de UNC5C dans le cancer colorectal (Bernet et al., 2008). De plus une étude récente sur le carcinome hépatocellulaire (HCC) (Jin et al.,

2011) montre une certaine corrélation entre la diminution de l'expression de *TrkC* dans des lignées cellulaires et des échantillons de HCC, et l'hyperméthylation de son promoteur. Une hyperméthylation du promoteur de *TrkC*, pourrait donc être responsable de l'inhibition de son expression. Un tel évènement épigénétique, décrit en introduction, est principalement associé à une extinction de l'expression génique, et plus particulièrement à l'inhibition de gènes suppresseurs de tumeurs comme RB, APC, MGMT, RASSF2A, CKN2A/p16, ..., impliqués dans les processus d'initiation, de progression et d'invasion tumorale (Grady & Carethers, 2008b; Migheli & Migliore, 2012). De plus, des logiciels de prédiction nous ont indiqué la présence d'un îlot CpG d'environ 3 kb au niveau de la région promotrice de *TrkC*. C'est dans ce contexte que nous avons décidé d'analyser le statut de méthylation de la région promotrice de *TrkC*, pour 30 couples d'échantillons normaux/tumoraux de notre cohorte de 45 patients. Pour ce faire, nous avons réalisé une conversion au bisulfite de l'ADN génomique, suivie d'un séquençage un peu particulier, le pyroséquençage, qui permet de détecter de manière quantitative la méthylation des cytosines (CpG) analysées. Il est alors apparu que le pourcentage de méthylation du promoteur de *TrkC* dans les échantillons tumoraux était largement et significativement supérieur à celui des échantillons normaux (Genevois et al., 2013). Cette hyperméthylation du promoteur étant inversement corrélée à l'expression de *TrkC*, nous avons montré qu'une dérégulation épigénétique était à l'origine de la perte d'expression de *TrkC* dans le cancer colorectal.

Afin de renforcer notre étude, nous avons fait générer des souris Lox- TRKC -Lox. Les croiser avec des souris Vilin-Cre nous permettra de supprimer de manière spécifique l'expression de *TrkC* dans le tractus intestinal, et de voir si l'absence de *TrkC* favorise l'initiation tumorale au cours du vieillissement des souris. Nous allons également croiser nos souris Lox- TRKC -Lox avec des souris APC^{1638N/+} prédisposantes pour les cancers intestinaux. Nous pourrions alors déterminer si l'absence de *TrkC* favorise la progression tumorale. De plus, l'inhibition de l'expression de *TrkC* conférant un avantage sélectif aux cellules tumorales, il n'est pas impossible qu'il soit retrouvé à l'avenir dans d'autres types de cancer, en quel cas nous pourrions croiser nos souris Lox-TRKC-Lox avec des souris possédant une cre-recombinase sous le contrôle d'un promoteur spécifique du cancer qui nous intéresse, ou avec des souris prédisposantes pour ce type de cancer.

Enfin, au cours de notre étude, nous avons testé l'effet de deux mutations de *TrkC* existant dans des pathologies humaines, et répertoriées dans le Catalogue des Mutations Somatiques dans les Cancers (COSMIC) (<http://cancer.sanger.ac.uk/cancergenome/projects/cosmic/>). L'une d'entre elle n'avait pas d'effet sur la mort induite par TRKC tandis que la seconde bloquait l'induction d'apoptose. Il s'agit donc d'une mutation inactivatrice de *TrkC*. *TrkC* n'étant pas exprimé dans les cancers colorectaux, l'intérêt de une telle mutation ne concerne pas ce type de cancer, mais comme c'est le cas pour DCC dans le cancer colorectal, pourrait être un mécanisme d'échappement à l'apoptose induite par TRKC dans les cancers où elle est retrouvée. De nombreuses mutations de *TrkC* dans une grande variété de cancers sont répertoriées dans COSMIC, et il serait intéressant de les investiguer, ce qui pourrait éventuellement donné lieu à la

génération d'une souris porteuse de l'une de ces mutations afin de développer un modèle d'étude *in vivo* de TRKC en tant que suppresseur de tumeur conditionnel. Dans le cas de DCC, c'est la mutation D1290N, au niveau de son site de clivage, qui inhibe l'activité pro-apoptotique de DCC dans un modèle de souris mutées et croisées avec des souris APC^{1638N/+} prédisposantes pour les cancers intestinaux (Castets et al., 2012).

2.2 – Le cancer colorectal, un terrain propice à une dérégulation de la régulation épigénétique ?

Une hyperméthylation semble donc responsable de l'effondrement de l'expression de *TrkC* dans le cancer colorectal. Mais quels sont les mécanismes sous-jacents à ces changements de l'épigénome ? Comme je l'ai décrit en introduction, l'établissement de marques de méthylation est un processus actif qui requiert des acteurs épigénétiques spécifiques, les ADN méthyltransférases, mais qui dépend également de la disponibilité en groupement méthyl. Le contrôle de l'activité de ces acteurs épigénétiques reste cependant mal connu.

De premiers éléments semblent indiquer que les mécanismes inflammatoires pourraient interagir avec les acteurs de la régulation épigénétique, et conduire à des changements de l'état de méthylation de l'ADN (Gasche et al., 2011; Hahn et al., 2008). Or on sait que l'environnement inflammatoire joue un rôle prépondérant lors de l'initiation et au cours de la progression tumorale des cancers colorectaux. En effet, chez l'homme, il a été observé depuis très longtemps qu'une inflammation chronique chez des patients atteints de la maladie de Crohn ou de rectocolite hémorragique, prédispose les malades à l'apparition de tumeurs dans l'intestin (Balkwill & Mantovani, 2001). Les mécanismes moléculaires permettant à l'inflammation de promouvoir le développement tumoral ne sont pas clairement établis, mais des études récentes ont montré que les cellules immunitaires et les cytokines joueraient un rôle important dans toutes les étapes de la tumorigenèse colorectale (Medema and Vermeulen, 2011). Ainsi, on peut penser que les phénomènes inflammatoires présents dans les cancers colorectaux pourraient induire une dérégulation de la méthylation de l'ADN des cellules, en agissant sur les DNMTs ou sur les protéines impliquées dans la dé-méthylation active. Il serait d'ailleurs intéressant de regarder le niveau d'expression des DNMTs et des autres acteurs de la régulation épigénétique dans les cancers colorectaux, afin d'amorcer une compréhension des mécanismes responsables de l'hyperméthylation de *TrkC*.

3 – Ré-exprimer le suppresseur de tumeurs conditionnel *TrkC* : une perspective thérapeutique.

Le point clé concernant les modifications épigénétiques, réside dans le fait qu'elles sont potentiellement réversibles. Or la recherche fondamentale en épigénétique tend actuellement à évoluer vers une phase translationnelle prometteuse, tandis que de nouvelles drogues thérapeutiques dirigées contre les mécanismes épigénétiques sont développées. Les mécanismes épigénétiques ont largement été décrits pour être impliqués en cancérogenèse, où l'on observe d'importantes altérations des niveaux de méthylation de l'ADN, des modifications épigénétiques ayant comme particularité d'être réversibles, donc pouvant être ciblées en thérapeutique.

Parmi les mécanismes épigénétiques, la méthylation de l'ADN est à l'origine de l'inhibition de l'expression des gènes dans les tumeurs, en particulier des gènes suppresseurs de tumeurs, dont on peut imaginer que la ré-expression pourrait conduire à une régression tumorale. Le mode d'action préférentiel pour agir sur la méthylation de l'ADN est d'inhiber les DNMTs. Les premiers inhibiteurs des DNMTs décrits sont les analogues de la cytidine : l'azacytidine (5-aza-cytidine) et la décitabine (5-aza-2'-deoxycytidine) (Taylor & Jones, 1980). Ces analogues des nucléotides s'incorporent dans l'ADN et se lient de façon covalente aux DNMTs, bloquant ainsi l'activité catalytique de l'enzyme (Mai & Altucci, 2009). L'aza-cytidine et la décitabine ont des effets anti-prolifératifs chez les cellules cancéreuses, et ont été approuvés par la FDA (Food & Drug Administration) pour le traitement des myélodysplasies. Cependant, ces composants présentent des effets secondaires toxiques et sont instables en solution aqueuse (Kantarjian et al., 2003). De plus, d'autres analogues, des nucleosides, ont été développés, comme par exemple DHAC (dihydro-5-azacytidine; développement stoppé), le 5-fluoro-2'-déoxycytidine, actuellement en phase I et II des essais cliniques, respectivement pour le traitement des tumeurs solides et des cancers hématologiques (Beumer et al., 2008), ou encore la zebularine (Robak, 2011). Ces traitements, moins toxiques et plus stables, ouvrent des perspectives thérapeutiques prometteuses.

Une autre possibilité pour agir contre l'hyperméthylation de l'ADN, c'est l'utilisation d'inhibiteurs des Histones DéAcétylases (HDACi). Les HDACs enlèvent les groupements acétyl présents sur les résidus lysines des histones, laissant ainsi le champ libre aux Histones Méthyl Transférase (HMTs) pour mettre en place la méthylation des histones. Inhiber l'action des HDAC est une manière indirecte de bloquer la méthylation des histones. Les HDACi constituent une nouvelle classe d'agents thérapeutiques anticancéreux. Nombres d'entre eux sont actuellement en essais cliniques, et ils ont déjà démontré leur efficacité contre une grande variété de cancers solides et hématologiques, à des doses bien supportées par les patients (Jones, 2007). L'un des intérêts de ces inhibiteurs est que les cellules saines y sont très peu sensibles. La Trichostatine A est l'un des HDACi les plus anciens, tandis que parmi les HDACi de seconde génération on trouve le vorinostat (SAHA), le belinostat (PXD101), l'entinostat (MS-275), ... A titre d'exemple, le SAHA fait actuellement l'objet de 242 essais cliniques, tandis que les effets du MS-275 sont testé

dans 28 essais cliniques (<http://www.clinicaltrials.gov/>). Le Vorinostat a été approuvé en octobre 2006 pour le traitement du lymphome cutané des cellules T.

Dans le cadre de notre étude sur l'inhibition de *TrkC* dans le cancer du colon, due à une hyperméthylation de son promoteur, nous avons testé l'effet de plusieurs drogues épigénétiques sur des lignées cellulaires cancéreuses de colon n'exprimant pas TRKC, dont nous avons montré l'hyperméthylation du promoteur. L'utilisation de la décitabine, un inhibiteur des DNMTs, et deux HDACi, le SAHA et le MS-275 ont eu le même effet, à savoir la réexpression de *TrkC*, en toute logique suite à la dé-méthylation de son promoteur. Considérant que TRKC est un suppresseur de tumeurs conditionnel dans le cancer colorectal, nous pouvons supposer que sa réexpression pourrait induire une régression tumorale chez les patients. Il serait intéressant de tester, dans les lignées cellulaires de colon, si la réexpression de *TrkC* entraîne une ré-induction de l'apoptose des cellules tumorales, due à la signalisation pro-apoptotique de TRKC. Sachant que ces lignées n'expriment pas ou très peu *NT-3*, *TrkC* ré-exprimé demeurerait non lié, et donc devrait avoir une action pro-apoptotique. Des expériences de xénogreffes *in vivo* chez des souris traitées avec des inhibiteurs de DNMTs et des HDACs pourraient donner une première idée de l'efficacité de ces drogues dans le cancer colorectal.

De manière plus générale, nous pouvons imaginer que dans le cas du cancer colorectal, où à la fois *TrkC* et *Unc5H* sont réprimés suite à une hyperméthylation de leurs régions promotrices, ré-exprimer ces suppresseurs de tumeurs conditionnels pourrait avoir un effet bénéfique d'un point de vue thérapeutique. Ainsi, l'utilisation combinée de ces inhibiteurs des DNMTs et des HDACs pourraient offrir une nouvelle perspective de traitement du cancer du colon, dans lequel les phénomènes d'hyperméthylation favorisent la croissance tumorale en bloquant l'expression des suppresseurs de tumeurs conditionnels que peuvent être les récepteurs à dépendance. Cependant, à ce jour, le manque de spécificité de ces drogues épigénétiques représente un inconvénient non négligeable, avec le risque de survenue d'effets secondaires tels que l'activation d'oncogènes, ou l'acquisition de caractéristiques souches due à une reprogrammation cellulaire. C'est pourquoi l'identification et le développement d'inhibiteurs épigénétiques possédant une réelle spécificité et des cibles bien déterminées, permettrait d'avoir un traitement pleinement profitable pour le patient et sans effet secondaire néfaste.

CONCLUSION

Au cours de ma thèse, j'ai pu mener et participer à des projets variés mais complémentaires. Ainsi, j'ai pu aborder des aspects fondamentaux de mon sujet de recherche, comme l'élucidation de la signalisation pro-apoptotique de TRKC, la caractérisation et la compréhension de la sur-expression de *NT-3* dans certains cancers et de la perte d'expression de *TrkC* dans le cancer colorectal ; mais j'ai également pu développer un aspect plus thérapeutique et appliqué dans la recherche d'agents inhibiteurs de l'interaction de NT-3 avec TRKC, et dans la tentative de ré-exprimer *TrkC* en agissant sur les acteurs de la régulation épigénétique.

Ainsi, quelques mois seulement après l'étude de l'équipe de William Grady montrant que le récepteur à tyrosine kinase RET, qui est également un RD, est un suppresseur de tumeur potentiel dans le cancer colorectal (Luo et al., 2012), j'ai moi-même montré que TRKC, un RD et un récepteur à tyrosine kinase, est lui aussi un tumeur suppresseur conditionnel. Ces deux études sont les premières montrant qu'un récepteur à tyrosine kinase, et en tant que tel considéré comme un proto-oncogène, peut être suppresseur de tumeurs dans certains contextes, ce qui ouvre de nouveaux champs d'investigation pour ces récepteurs.

La mise en évidence chez les patients atteints de cancer du rein et du poumon, de population sur-exprimant *NT-3* et exprimant *TrkC*, est une nouvelle perspective de thérapie pour ces patients. Avoir identifié le couple NT-3/TRKC est une première étape dans le développement d'une thérapie ciblée, et nous devons d'autant plus travailler à l'identification d'un agent thérapeutique efficace, spécifique, et dépourvu d'effets secondaires. Restera ensuite à mettre en place un test permettant de détecter chez les patients ceux pour qui ces thérapies seraient bénéfiques. Réexprimer *TrkC* dans le cancer du colon afin qu'il puisse jouer son rôle de suppresseur de tumeurs est une autre thérapie potentielle prometteuse, d'autant plus que plusieurs agents thérapeutiques capables de cibler la régulation épigénétique sont déjà en essais cliniques pour un certain nombre de pathologies. La caractérisation de l'induction de mort de TRKC passant par la mort intrinsèque ouvre elle aussi la voie à une troisième stratégie, qui consisterait à cibler la voie mitochondriale, sachant que des agents la ciblant existent déjà. On peut aussi imaginer que ces trois approches puissent être combinées entre elles et avec des agents ciblant l'activité tyrosine kinase de TRKC. Le couple NT-3/TRKC semble donc être définitivement une cible thérapeutique prometteuse.

BIBLIOGRAPHIE

Aguilera, O., Fraga, M., Ballestar, E., Paz, M., Herranz, M., Espada, J., García, J., Muñoz, A., Esteller, M., and González-Sancho, J. (2006). Epigenetic inactivation of the Wnt antagonist DICKKOPF-1 (DKK-1) gene in human colorectal cancer. *Oncogene* 25, 4116–4121.

Aliaga, J. (1999). Requirement of the MAP kinase cascade for cell cycle progression and differentiation of human intestinal cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 277, G631–G641.

Amaral, P.P., Dinger, M.E., Mercer, T.R., and Mattick, J.S. (2008). The eukaryotic genome as an RNA machine. *Science (New York, N.Y.)* 319, 1787–1789.

Antequera, F., and Bird, a (1993). Number of CpG islands and genes in human and mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 11995–11999.

Antignani, A., and Youle, R.J. (2006). How do Bax and Bak lead to permeabilization of the outer mitochondrial membrane? *Current Opinion in Cell Biology* 18, 685–689.

Arabi, a. (2003). Accumulation of c-Myc and proteasomes at the nucleoli of cells containing elevated c-Myc protein levels. *Journal of Cell Science* 116, 1707–1717.

Arévalo, J.C., and Wu, S.H. (2006). Neurotrophin signaling: many exciting surprises! *Cellular and Molecular Life Sciences*: CMLS 63, 1523–1537.

Balkwill, F., and Mantovani, a (2001). Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* 357, 539–545.

Bannister, A.J., and Kouzarides, T. (2011). Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Research* 21, 381–395.

Barker N. et al. (2009). Crypt stem cells as the cells-of-origin of intestinal cancer. *Nature* 457, 608–611.

Bartel, D.P., Lee, R., and Feinbaum, R. (2004). MicroRNAs: Genomics , Biogenesis , Mechanism , and Function *Genomics*: The miRNA Genes. 116, 281–297.

Baylin, S.B. (2005). DNA methylation and gene silencing in cancer. *Nature Clinical Practice Oncology* 2, 4–11.

Baylin, S.B., Esteller, M., Rountree, M.R., Bachman, K.E., Schuebel, K., and Herman, J.G. (2001). Aberrant patterns of DNA methylation, chromatin formation and gene expression in cancer. *Human Molecular Genetics* 10, 687–692.

Berger, A.H., and Pandolfi, P.P. (2011). Haplo-insufficiency: a driving force in cancer. *The Journal of Pathology* 223, 137–146.

Bernet, A., Mazelin, L., Coissieux, M., Gadot, N., Susan, L., Scoazec, J., and Mehlen, P. (2008). Inactivation of the UNC5C netrin-1 receptor is associated with tumor progression in colorectal malignancies. *Gastroenterology* 133, 1840–1848.

- Beumer, J.H., Parise, R. a, Newman, E.M., Doroshow, J.H., Synold, T.W., Lenz, H.-J., and Egorin, M.J. (2008). Concentrations of the DNA methyltransferase inhibitor 5-fluoro-2'-deoxycytidine (FdCyd) and its cytotoxic metabolites in plasma of patients treated with FdCyd and tetrahydrouridine (THU). *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 62, 363–368.
- Bhaumik, S.R., Smith, E., and Shilatifard, A. (2007). Covalent modifications of histones during development and disease pathogenesis. *Nature Structural & Molecular Biology* 14, 1008–1016.
- Bhutani, N., Burns, D.M., and Blau, H.M. (2011). DNA demethylation dynamics. *Cell* 146, 866–872.
- Bibel, M., and Barde, Y. (2000). Neurotrophins: key regulators of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous system. *Genes & Development* 14, 2919–2937.
- Bird, A. (1986). CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature* 321, 209–213.
- Bird, A. (2002). DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes & Development* 16, 6–21.
- Blasco-Gutiérrez, M., San José-Crespo, I., Zozaya-Alvarez, E., Ramos-Sanchez, R., and Garcia-Atarés, N. (2007). TrkC: A New Predictive Marker in Breast Cancer? *Cancer Investigation* 25, 405–410.
- 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. *The EMBO Journal* 19, 4056–4063.
- Boucher, J., Macotela, Y., Bezy, O., Mori, M. a, Kriauciunas, K., and Kahn, C.R. (2010). A kinase-independent role for unoccupied insulin and IGF-1 receptors in the control of apoptosis. *Science Signaling* 3, ra87.
- Bouzas-rodriguez, J., Cabrera, J.R., Delloye-bourgeois, C., Ichim, G., Delcros, J., Raquin, M., Rousseau, R., Combaret, V., Bénard, J., Tauszig-delamasure, S., et al. (2010). Neurotrophin-3 production promotes human neuroblastoma cell survival by inhibiting TrkC-induced apoptosis. *120*.
- Bredesen, D.E., Mehlen, P., and Rabizadeh, S. (2005). Receptors that mediate cellular dependence. *Cell Death and Differentiation* 12, 1031–1043.
- Brenner, C., and Grimm, S. (2006). The permeability transition pore complex in cancer cell death. *Oncogene* 25, 4744–4756.
- Brodeur, G.M. (2003). Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. *Nature Reviews. Cancer* 3, 203–216.
- Brodeur, G.M., Minturn, J.E., Ho, R., Simpson, A.M., Iyer, R., Varela, C.R., Light, J.E., Kolla, V., and Evans, A.E. (2009). Trk receptor expression and inhibition in neuroblastomas. *Clinical Cancer Research*: an Official Journal of the American Association for Cancer Research 15, 3244–3250.
- Bruniquel, D., and Schwartz, R.H. (2003). Selective, stable demethylation of the interleukin-2 gene enhances transcription by an active process. *Nature Immunology* 4, 235–240.
- Burrows, A.E., Smogorzewska, A., and Elledge, S.J. (2010). Polybromo-associated BRG1-associated factor components BRD7 and BAF180 are critical regulators of p53 required for induction of replicative senescence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 14280–14285.

- Cairns, B.R. (2009). The logic of chromatin architecture and remodelling at promoters. *Nature* 461, 193–198.
- Castets, M., Broutier, L., Molin, Y., Brevet, M., Chazot, G., Gadot, N., Paquet, A., Mazelin, L., Jarrosson-Wuilleme, L., Scoazec, J.-Y., et al. (2012). DCC constrains tumour progression via its dependence receptor activity. *Nature* 482, 534–537.
- Caterino, T.L., and Hayes, J.J. (2007). Chromatin structure depends on what's in the nucleosome's pocket. *Nature Structural & Molecular Biology* 14, 1056–1058.
- Chai, J., Du, C., Wu, J.W., Kyin, S., Wang, X., and Shi, Y. (2000). Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO. *Nature* 406, 855–862.
- Chalazonitis, A. (2004). Neurotrophin-3 in the development of the enteric nervous system. *Progress in Brain Research* 146, 243–263.
- Chalazonitis, a, Pham, T.D., Rothman, T.P., DiStefano, P.S., Bothwell, M., Blair-Flynn, J., Tessarollo, L., and Gershon, M.D. (2001). Neurotrophin-3 is required for the survival-differentiation of subsets of developing enteric neurons. *The Journal of Neuroscience*: the Official Journal of the Society for Neuroscience 21, 5620–5636.
- Chambers, A.F., Groom, A.C., and MacDonald, I.C. (2002). Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nature Reviews. Cancer* 2, 563–572.
- Chattopadhyay, S., Marques, J.T., Yamashita, M., Peters, K.L., Smith, K., Desai, A., Williams, B.R.G., and Sen, G.C. (2010). Viral apoptosis is induced by IRF-3-mediated activation of Bax. *The EMBO Journal* 29, 1762–1773.
- Chedin, F., Lieber, M.R., and Hsieh, C.-L. (2002). The DNA methyltransferase-like protein DNMT3L stimulates de novo methylation by Dnmt3a. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 16916–16921.
- Chow, J., and Heard, E. (2009). X inactivation and the complexities of silencing a sex chromosome. *Current Opinion in Cell Biology* 21, 359–366.
- Clark, S., Harrison, J., and Frommer, M. (1995). CpNpG methylation in mammalian cells. *Nature Genetics* 20–27.
- Collins, L.J., and Chen, X.S. (2009). The RNA biology of the eukaryotic ancestor. 495–502.
- Collins, L.J., and Penny, D. (2009). The RNA infrastructure: dark matter of the eukaryotic cell? *Trends in Genetics*: TIG 25, 120–128.
- Condorelli, F., Salomoni, P., Cotteret, S., Cesi, V., Srinivasula, S.M., Alnemri, E.S., and Calabretta, B. (2001). Caspase Cleavage Enhances the Apoptosis-Inducing Effects of BAD Caspase Cleavage Enhances the Apoptosis-Inducing Effects of BAD.
- Crowley, C., Spencer, S., Nishimura, M., Chen, K., Pitts-Meek, S., Armanini, M., Ling, L., McMahon, S., Shelton, D., Levinson, A., et al. (1994). Mice lacking nerve growth factor display perinatal loss of sensory and sympathetic neurons yet develop basal forebrain cholinergic neurons. *Cell* 76, 1001–1011.

Cui, H., Cruz-Correa, M., Giardiello, F.M., Hutcheon, D.F., Kafonek, D.R., Brandenburg, S., Wu, Y., He, X., Powe, N.R., and Feinberg, A.P. (2003). Loss of IGF2 imprinting: a potential marker of colorectal cancer risk. *Science (New York, N.Y.)* **299**, 1753–1755.

Curtin, J.F., and Cotter, T.G. (2003). Live and let die: regulatory mechanisms in Fas-mediated apoptosis. *Cellular Signalling* **15**, 983–992.

Datta, S., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y., and Greenberg, M. (1997). Akt Phosphorylation of BAD Couples Survival Signals to the cell-Intrinsic Death Machinery. *Cell* **91**, 231–241.

Davis, R.L., and Turner, D.L. (2001). Vertebrate hairy and Enhancer of split related proteins: transcriptional repressors regulating cellular differentiation and embryonic patterning. *Oncogene* **20**, 8342–8357.

Deheuninck, J., Goormachtigh, G., Foveau, B., Ji, Z., Leroy, C., Ancot, F., Villeret, V., Tulasne, D., and Fafeur, V. (2009). Phosphorylation of the MET receptor on juxtamembrane tyrosine residue 1001 inhibits its caspase-dependent cleavage. *Cellular Signalling* **21**, 1455–1463.

Delloye-Bourgeois, C., Brambilla, E., Coissieux, M.-M., Guenebeaud, C., Pedoux, 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. *Journal of the National Cancer Institute* **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. *The Journal of Experimental Medicine* **206**, 833–847.

Deplus, R., Brenner, C., Burgers, W. a, Putmans, P., Kouzarides, T., De Launoit, Y., and Fuks, F. (2002). Dnmt3L is a transcriptional repressor that recruits histone deacetylase. *Nucleic Acids Research* **30**, 3831–3838.

Doerfler, W. (1983). Dna methylation and gene activity. *Ann. Rev. Biochem.* **93**–124.

Donovan, M.J., Miranda, R.C., Kraemer, R., McCaffrey, T. a, Tessarollo, L., Mahadeo, D., Sharif, S., Kaplan, D.R., Tsoulfas, P., and Parada, L. (1995). Neurotrophin and neurotrophin receptors in vascular smooth muscle cells. Regulation of expression in response to injury. *The American Journal of Pathology* **147**, 309–324.

Eguchi, M., Eguchi-Ishimae, M., Tojo, a, Morishita, K., Suzuki, K., Sato, Y., Kudoh, S., Tanaka, K., Setoyama, M., Nagamura, F., et al. (1999). Fusion of ETV6 to neurotrophin-3 receptor TRKC in acute myeloid leukemia with t(12;15)(p13;q25). *Blood* **93**, 1355–1363.

Ehrlich, M. (2002). DNA methylation in cancer: too much, but also too little. *Oncogene* **21**, 5400–5413.

Elgin, S.C.R., and Grewal, S.I.S. (2003). Heterochromatin: silence is golden. *Current Biology : CB* **13**, R895–8.

Ellerby, L.M., Hackam, A.S., Propp, S.S., Ellerby, H.M., Rabizadeh, S., Cashman, N.R., Trifiro, M.A., Pinsky, L., Wellington, C.L., Salvesen, G.S., et al. (1999). Kennedy ' s Disease : Caspase Cleavage of the Androgen Receptor Is a Crucial Event in Cytotoxicity.

Ellis, H.M., and Horvitz, H.R. (1986). Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell* **44**, 817–829.

- Ernfors, P., Kucera, J., Lee, K.F., Loring, J., and Jaenisch, R. (1995). Studies on the physiological role of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 in knockout mice. *The International Journal of Developmental Biology* 39, 799–807.
- Esteller, M. (2005). Aberrant DNA methylation as a cancer-inducing mechanism. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 45, 629–656.
- Esteller, M., and Almouzni, G. (2005). How epigenetics integrates nuclear functions. *Workshop on epigenetics and chromatin: transcriptional regulation and beyond. EMBO Reports* 6, 624–628.
- Farazi, T.A., Spitzer, J.I., Morozov, P., and Tuschl, T. (2012). NIH Public Access. 223, 102–115.
- Farinas, I., Wilkinson, G., Backus, C., Reichardt, L., and Patapoutian, A. (1998). Characterization of neurotrophin and Trk Receptor functions in developing sensory ganglia: direct NT-3 activation of TrkB neurons in vivo. *Neuron* 21, 325–334.
- Fariñas, I., Yoshida, C.K., Backus, C., and Reichardt, L.F. (1996). Lack of Neurotrophin-3 results in death of spinal sensory neurons and premature differentiation of their precursors. *Neuron* 17, 1065–1078.
- Fearon, E.F., and Vogelstein, B. (1990). for Colorectal Tumorigenesis. 61, 759–767.
- Fearon, E., Cho, K., Nigro, J., Kern, S., Simons, J., Ruppert, J., Hamilton, S., Preisinger, A., Thomas, G., and Kinzler, K. (1990). Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers. *Science* 247, 49–56.
- Feinberg, A., and Vogelstein, B. (1983). Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature* 301, 89–92.
- Feinberg, A.P., Ohlsson, R., and Henikoff, S. (2006). The epigenetic progenitor origin of human cancer. *Nature Reviews. Genetics* 7, 21–33.
- Ferguson-smith, A.C., and Grealley, J.M. (2007). Perceptive enzymes. 449.
- Filion, G.J., Van Bommel, J.G., Braunschweig, U., Talhout, W., Kind, J., Ward, L.D., Brugman, W., De Castro, I.J., Kerkhoven, R.M., Bussemaker, H.J., et al. (2010). Systematic protein location mapping reveals five principal chromatin types in *Drosophila* cells. *Cell* 143, 212–224.
- Fischer, A., Klamt, B., Schumacher, N., Glaeser, C., Hansmann, I., Fenge, H., and Gessler, M. (2004). Phenotypic variability in *Hey2* ^{-/-} mice and absence of *HEY2* mutations in patients with congenital heart defects or Alagille syndrome. *Mammalian Genome: Official Journal of the International Mammalian Genome Society* 15, 711–716.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 4850–4855.
- Fombonne, J., Bissey, P., Guix, C., Sadoul, R., Thibert, C., and Mehlen, P. (2012). Patched dependence receptor triggers apoptosis through ubiquitination of caspase-9.
- Fong, H., Wong, R.C.-B., and Donovan, P.J. (2012). Transcriptional regulation of TRKC by SOX2 in human embryonic stem cells. *Stem Cell Research* 8, 206–214.

- Forcet, C., Ye, X., Granger, L., Corset, V., Shin, H., Bredesen, D.E., and Mehlen, P. (2001). The dependence receptor DCC (deleted in colorectal cancer) defines an alternative mechanism for caspase activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 3416–3421.
- 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. *Biochimica Et Biophysica Acta* **1793**, 231–238.
- Galluzzi, L., Vitale, I., Abrams, J.M., Alnemri, E.S., Baehrecke, E.H., Blagosklonny, M. V, Dawson, T.M., Dawson, V.L., El-Deiry, W.S., Fulda, S., et al. (2012). Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death and Differentiation* **19**, 107–120.
- Gasche, J., Hoffmann, J., Boland, C., and Goel, A. (2011). Interleukin-6 Promotes Tumorigenesis by Altering DNA Methylation in Oral Cancer Cells. *Int J Cancer* **129**, 1053–1063.
- Genevois, A.-L., Ichim, G., Coissieux, M.-M., Lambert, M.-P., Laval, F., Goldschneider, D., Jarrosson-Wuilleme, L., Lepinasse, F., Gouysse, G., Herceg, Z., et al. (2013). Dependence receptor TrkC is a putative colon cancer tumor suppressor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**, 3017–3022.
- Gilbert, N., Boyle, S., Fiegler, H., Woodfine, K., Carter, N.P., and Bickmore, W. a (2004). Chromatin architecture of the human genome: gene-rich domains are enriched in open chromatin fibers. *Cell* **118**, 555–566.
- Glass, J.L., Fazzari, M.J., Ferguson-Smith, A.C., and Grealley, J.M. (2009). CG dinucleotide periodicities recognized by the Dnmt3a-Dnmt3L complex are distinctive at retroelements and imprinted domains. *Mammalian Genome : Official Journal of the International Mammalian Genome Society* **20**, 633–643.
- Goldfarb, D.S., Corbett, A.H., Mason, D.A., Harreman, M.T., and Adam, S. a (2004). Importin alpha: a multipurpose nuclear-transport receptor. *Trends in Cell Biology* **14**, 505–514.
- Goldschneider, D., and Mehlen, P. (2010). Dependence receptors: a new paradigm in cell signaling and cancer therapy. *Oncogene* **29**, 1865–1882.
- Goll, M.G., Kirpekar, F., Maggert, K. a, Yoder, J. a, Hsieh, C.-L., Zhang, X., Golic, K.G., Jacobsen, S.E., and Bestor, T.H. (2006). Methylation of tRNA^{Asp} by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2. *Science (New York, N.Y.)* **311**, 395–398.
- Grady, W., and Carethers, J. (2008a). Genomic and Epigenetic Instability in Colorectal Cancer Pathogenesis. *Gastroenterology*. **135**, 1079–1099.
- Grady, W., and Carethers, J. (2008b). Genomic and Epigenetic Instability in Colorectal Cancer Pathogenesis. *Gastroenterology* **135**, 1079–1099.
- Gregorieff, A., and Clevers, H. (2005). Wnt signaling in the intestinal epithelium: from endoderm to cancer. *Genes & Development* **19**, 877–890.
- Grønbaek, K., Hother, C., and Jones, P.A. (2007). Epigenetic changes in cancer. **1039–1059**.
- Gryfe, R. (1997). Molecular biology of colorectal cancer. *Curr Probl Cancer*. **21(5)**, 233–300.

- Guo X, W.X. (2009). Signaling cross-talk between TGF-beta/BMP and other pathways. *Cell Res.* **19**(1), 71–88.
- Hagag, N., Halegoua, S., and Viola, M. (1986). Inhibition of growth factor-induced differentiation of PC12 cells by microinjection of antibody to ras p21. *Nature* **319**, 680–682.
- Hahn, M. a, Hahn, T., Lee, D.-H., Esworthy, R.S., Kim, B.-W., Riggs, A.D., Chu, F.-F., and Pfeifer, G.P. (2008). Methylation of polycomb target genes in intestinal cancer is mediated by inflammation. *Cancer Research* **68**, 10280–10289.
- Hajkova, P., Erhardt, S., Lane, N., Haaf, T., El-Maarri, O., Reik, W., Walter, J., and Surani, M.A. (2002). Epigenetic reprogramming in mouse primordial germ cells. *Mechanisms of Development* **117**, 15–23.
- Hake, S.B., and Allis, C.D. (2006). Histone H3 variants and their potential role in indexing mammalian genomes: the “H3 barcode hypothesis”. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 6428–6435.
- Hansen, K.D., Timp, W., Bravo, H.C., Langmead, B., Mcdonald, O.G., Wen, B., Wu, H., Diep, D., Briem, E., Zhang, K., et al. (2011). Increased methylation variation in epigenetic domains across cancer types. *Nature Genetics* **43**, 768–775.
- He, Y., Li, B., Li, Z., Liu, P., Wang, Y., and Tang, Q. (2011). Tet-Mediated Formation of 5-Carboxylcytosine and Its excision by TDG in Mammalian DNA. *Science* **333**, 1303–1307.
- Van Heemst, D., Den Reijer, P.M., and Westendorp, R.G.J. (2007). Ageing or cancer: a review on the role of caretakers and gatekeepers. *European Journal of Cancer (Oxford, England : 1990)* **43**, 2144–2152.
- Henikoff, S., and Ahmad, K. (2005). Assembly of variant histones into chromatin. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **21**, 133–153.
- Henry, M., Tashjian, D., and Breuer, C. (2005). Neuroblastoma update. *Curr Opin Oncol.* **19**–23.
- Herceg, Z. (2007). Epigenetics and cancer: towards an evaluation of the impact of environmental and dietary factors. *Mutagenesis* **22**, 91–103.
- Herceg, Z., and Hainaut, P. (2007). Genetic and epigenetic alterations as biomarkers for cancer detection, diagnosis and prognosis. *Molecular Oncology* **1**, 26–41.
- Herceg, Z., and Paliwal, A. (2011). Epigenetic mechanisms in hepatocellular carcinoma: how environmental factors influence the epigenome. *Mutation Research* **727**, 55–61.
- Herceg, Z., and Vaissière, T. (2011). Epigenetic mechanisms and cancer: an interface between the environment and the genome. *Epigenetics : Official Journal of the DNA Methylation Society* **6**, 804–819.
- Hiltunen, J.O., Arumäe, U., Moshnyakov, M., and Saarma, M. (1996). Expression of mRNAs for Neurotrophins and Their Receptors in Developing Rat Heart. *Circulation Research* **79**, 930–939.
- Ho, R., Eggert, A., Hishiki, T., Minturn, J.E., Ikegaki, N., Foster, P., Camoratto, A.M., Evans, A.E., and Brodeur, G.M. (2002). Resistance to Chemotherapy Mediated by TrkB in Neuroblastomas Resistance to Chemotherapy Mediated by TrkB in Neuroblastomas **1**. 6462–6466.
- Huang, E., and Reichardt, L.F. (2003). Neurotrophins: Roles in Neuronal development and Function. *Annu Rev Neurosci* **24**, 677–736.

- Huang, T.H.-M., and Esteller, M. (2010). Chromatin remodeling in mammary gland differentiation and breast tumorigenesis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2, a004515.
- Huang, Q., Raya, A., DeJesus, P., Chao, S.-H., Quon, K.C., Caldwell, J.S., Chanda, S.K., Izpisua-Belmonte, J.C., and Schultz, P.G. (2004). Identification of p53 regulators by genome-wide functional analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 3456–3461.
- Ichim, G., Tauszig-Delamasure, S., and Mehlen, P. (2012). Neurotrophins and cell death. *Experimental Cell Research* 318, 1221–1228.
- Ichim, G., Genevois, A.-L., Ménard, M., Yu, L.-Y., Coelho-Aguiar, J.M., Llambi, F., Jarrosson-Wuilleme, L., Lefebvre, J., Tulasne, D., Dupin, E., et al. (2013). The dependence receptor TrkC triggers mitochondria-dependent apoptosis upon Cobra-1 recruitment. *Molecular Cell* 51, 632–646.
- Inoue, K., Ozaki, S., Shiga, T., Ito, K., Masuda, T., Okado, N., Iseda, T., Kawaguchi, S., Ogawa, M., Bae, S.-C., et al. (2002). Runx3 controls the axonal projection of proprioceptive dorsal root ganglion neurons. *Nature Neuroscience* 5, 946–954.
- Ito, S., Shen, L., Dai, Q., Wu, S.C., Collins, L.B., Swenberg, J. a, He, C., and Zhang, Y. (2011). Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine. *Science (New York, N.Y.)* 333, 1300–1303.
- Izzotti, A., Calin, G. a, Arrigo, P., Steele, V.E., Croce, C.M., and De Flora, S. (2009). Downregulation of microRNA expression in the lungs of rats exposed to cigarette smoke. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 23, 806–812.
- Izzotti, A., Larghero, P., Cartiglia, C., Longobardi, M., Pfeffer, U., Steele, V.E., and De Flora, S. (2010). Modulation of microRNA expression by budesonide, phenethyl isothiocyanate and cigarette smoke in mouse liver and lung. *Carcinogenesis* 31, 894–901.
- Jaenisch, R., and Bird, A. (2003). Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nature Genetics* 33 Suppl, 245–254.
- Jia, D., Jurkowska, R.Z., Zhang, X., Jeltsch, A., and Cheng, X. (2007). Structure of Dnmt3a bound to Dnmt3L suggests a model for de novo DNA methylation. *Nature* 449, 248–251.
- Jin, W., Lee, J.-J., Kim, M.S., Son, B.H., Cho, Y.K., and Kim, H.-P. (2011). DNA methylation-dependent regulation of TrkA, TrkB, and TrkC genes in human hepatocellular carcinoma. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 406, 89–95.
- Kane, M.F., Loda, M., Gaida, G.M., Tumor, H., Lines, C., Lipman, J., Mishra, R., Goldman, H., and Milburn, J. (1997). Methylation of the hMLH1 Promoter Correlates with Lack of Expression of hMLH1 in Sporadic Colon Tumors and Mismatch hMLH1 in Sporadic Colon Tumors and Mismatch Repair-defective. *Cancer Research* 57, 808–811.
- Kantarjian, H.M., O'Brien, S., Cortes, J., Giles, F.J., Faderl, S., Issa, J.-P., Garcia-Manero, G., Rios, M.B., Shan, J., Andreeff, M., et al. (2003). Results of decitabine (5-aza-2'-deoxycytidine) therapy in 130 patients with chronic myelogenous leukemia. *Cancer* 98, 522–528.
- Karpf, A.R., and Matsui, S. (2005). Genetic disruption of cytosine DNA methyltransferase enzymes induces chromosomal instability in human cancer cells. *Cancer Research* 65, 8635–8639.

- Kerr, J., Wyllie, A., and Currie, A. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with Wide-Ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26, 239.
- Kim, J.Y.H., Sutton, M.E., Lu, D.J., Cho, T.A., Goumnerova, L.C., Goritchenko, L., Kaufman, J.R., Lam, K.K., Billet, A.L., Tarbell, N.J., et al. (1999). Activation of Neurotrophin-3 Receptor TrkC Induces Apoptosis in Medulloblastomas Activation of Neurotrophin-3 Receptor TrkC Induces Apoptosis. 711–719.
- Kisseljova, N.P., and Kisseljov, F.L. (2005). DNA demethylation and carcinogenesis. *Biochemistry. Biokhimiia* 70, 743–752.
- Kitade, Y., and Akao, Y. (2010). MicroRNAs and Their Therapeutic Potential for Human Diseases: MicroRNAs, miR-143 and -145, Function as Anti-oncomirs and the Application of Chemically Modified miR-143 as an Anti-cancer Drug. *Journal of Pharmacological Sciences* 114, 276–280.
- Knezevich, S., MacFadden, D., Tao, W., Lim, J., and Sorensen, P. (1998). A novel ETV6-NTRK3 gene fusion in congenital fibrosarcoma. *Nat Genet.* 18.
- Knudson, a G. (1971). Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 68, 820–823.
- Knudson, a G. (1985). Hereditary cancer, oncogenes, and antioncogenes. *Cancer Research* 45, 1437–1443.
- Korinek, V., Barker, N., Moerer, P., Van Donselaar, E., Huls, G., Peters, P.J., and Clevers, H. (1998). Depletion of epithelial stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking Tcf-4. *Nature Genetics* 19, 379–383.
- Kouzarides, T. (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell* 128, 693–705.
- Kroemer, G., Galluzzi, L., and Brenner, C. (2007). Mitochondrial Membrane Permeabilization in Cell Death. 99–163.
- Kurokawa, R., Rosenfeld, M.G., and Glass, C.K. (2009). Transcriptional regulation through noncoding RNAs and epigenetic modifications. *RNA Biology* 6, 233–236.
- Kwon, M.J., Kim, S.-H., Jeong, H.M., Jung, H.S., Kim, S.-S., Lee, J.E., Gye, M.C., Erkin, O.C., Koh, S.S., Choi, Y.-L., et al. (2011). Claudin-4 overexpression is associated with epigenetic derepression in gastric carcinoma. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology* 91, 1652–1667.
- Lamballe, F., Klein, R., and Barbacid, M. (1991). trkC, a new member of the trk family of tyrosine protein kinases, is a receptor for neurotrophin-3. *Cell* 66, 967–979.
- Lamkanfi, M., Festjens, N., Declercq, W., Vanden Berghe, T., and Vandenabeele, P. (2007). Caspases in cell survival, proliferation and differentiation. *Cell Death and Differentiation* 14, 44–55.
- Lao, V., and Grady, W. (2012). Epigenetics and colorectal cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 8, 686–700.
- Leedham, S.J., Brittan, M., McDonald, S. a C., and Wright, N. a (2005). Intestinal stem cells. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 9, 11–24.
- Lefebvre, J., Muharram, G., Leroy, C., Kherrouche, Z., Montagne, R., Ichim, G., Tauszig-Delamasure, S., Chotteau-Lelievre, a, Brenner, C., Mehlen, P., et al. (2013). Caspase-generated fragment of the Met

receptor favors apoptosis via the intrinsic pathway independently of its tyrosine kinase activity. *Cell Death & Disease* 4, e871.

Levanon, D., Bettoun, D., Harris-Cerruti, C., Woolf, E., Negreanu, V., Eilam, R., Bernstein, Y., Goldenberg, D., Xiao, C., Fliegauf, M., et al. (2002). The Runx3 transcription factor regulates development and survival of TrkC dorsal root ganglia neurons. *The EMBO Journal* 21, 3454–3463.

Levi-Mintacini, R., and Angeletti, P. (1963). Essential role of the nerve growth factor in the survival and maintenance of dissociated sensory and sympathetic embryonic nerve cells in vitro. *Dev Biol.* 6, 653–659.

Li, E., Bestor, T.H., and Jaenisch, R. (1992). Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell* 69, 915–926.

Li, L.Y., Luo, X., and Wang, X. (2001). Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* 412, 95–99.

Liqin Zhu¹, Paul Gibson¹, D. Spencer Currie¹, Yiai Tong¹, Robert J. Richardson¹, I.T., Bayazitov¹, Helen Poppleton¹, Stanislav Zakharenko¹, David W. Ellison², and R.J., and Gilbertson^{1, 3} (2009). Prominin1 marks intestinal stem cells that are susceptible to neoplastic transformation. *Nature* 457(7229), 603–607.

Lister, R., Pelizzola, M., Dowen, R.H., Hawkins, R.D., Hon, G., Tonti-Filippini, J., Nery, J.R., Lee, L., Ye, Z., Ngo, Q.-M., et al. (2009). Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature* 462, 315–322.

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

Luo, Y., Tsuchiya, K.D., Il Park, D., Fausel, R., Kanngurn, S., Welcsh, P., Dzieciatkowski, D., Wang, J., and Grady, J. (2012). RET is a potential tumor suppressor gene in colorectal cancer. *Oncogene* 32, 2037–2047.

Lusher, M.E., Lindsey, J.C., Latif, F., Pearson, A.D.J., Ellison, D.W., and Clifford, S.C. (2002). Biallelic Epigenetic Inactivation of the RASSF1A Tumor Suppressor Gene in Medulloblastoma Development Biallelic Epigenetic Inactivation of the RASSF1A Tumor Suppressor Gene in. 5906–5911.

Ma, D.K., Jang, M.-H., Guo, J.U., Kitabatake, Y., Chang, M.-L., Pow-Anpongkul, N., Flavell, R. a, Lu, B., Ming, G.-L., and Song, H. (2009). Neuronal activity-induced Gadd45b promotes epigenetic DNA demethylation and adult neurogenesis. *Science (New York, N.Y.)* 323, 1074–1077.

Mai, A., and Altucci, L. (2009). Epi-drugs to fight cancer: from chemistry to cancer treatment, the road ahead. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 41, 199–213.

Markowitz, S., Wang, J., Myeroff, L., Parsons, R., Sun, L., Lutterbaugh, J., Fan, R.S., Brattain, M., and Willson, J.K. V (1995). development (1-5). *Science* 268, 1336–1338.

Marmigère, F., and Ernfors, P. (2007). Specification and connectivity of neuronal subtypes in the sensory lineage. *Nature Reviews. Neuroscience* 8, 114–127.

Martin, D.P., Schmidt, R.E., DiStefano, P.S., Lowry, O.H., Carter, J.G., and Johnson, E.M. (1988). Inhibitors of protein synthesis and RNA synthesis prevent neuronal death caused by nerve growth factor deprivation. *The Journal of Cell Biology* 106, 829–844.

Martin-Zanca, D., Hughes, S., and Barbacid, M. (1986). A human oncogene formed by the fusion of truncated tropomyosin and protein tyrosine kinase sequences. *Nature* 319, 743–748.

Marzo, A.M. De, Marchi, V.L., Yang, E.S., Carcinogenesis, C., Veeraswamy, R., Lin, X., and Nelson, W.G. (1999). Abnormal Regulation of DNA Methyltransferase Expression during Colorectal Carcinogenesis Advances in Brief Abnormal Regulation of DNA Methyltransferase Expression during. 3855–3860.

Matsumoto, K., Wada, R.K., Yamashiro, J.M., Kaplan, D.R., and Thiele, C.J. (1995). Expression of Brain-derived Neurotrophic Factor and p145 TrkB Affects Survival , Differentiation , and Invasiveness of Human Neuroblastoma Cells Expression of Brain-derived. Cancer Research 1798–1806.

Matsunaga, E., Tauszig-Delamasure, S., Monnier, P.P., Mueller, B.K., Strittmatter, S.M., Mehlen, P., and Chédotal, A. (2004). RGM and its receptor neogenin regulate neuronal survival. Nature Cell Biology 6, 749–755.

Mattick, J.S. (2009). The genetic signatures of noncoding RNAs. PLoS Genetics 5, e1000459.

Mayer, W., Niveleau, a, Walter, J., Fundele, R., and Haaf, T. (2000). Demethylation of the zygotic paternal genome. Nature 403, 501–502.

McDonald, S. a C., Preston, S.L., Lovell, M.J., Wright, N. a, and Jankowski, J. a Z. (2006). Mechanisms of disease: from stem cells to colorectal cancer. Nature Clinical Practice. Gastroenterology & Hepatology 3, 267–274.

McGregor, L.M., Baylin, S.B., Griffin, C.A., Hawkins, A.L., and Nelkin, B.D. (1994). Molecular cloning of the cDNA for human TrkC (NTRK3), chromosomal assignment, and evidence for a splice variant. Genomics 22, 267–272.

Medema, J.P., and Vermeulen, L. (2011). Microenvironmental regulation of stem cells in intestinal homeostasis and cancer. Nature 474, 318–326.

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.

Migheli, F., and Migliore, L. (2012). Epigenetics of colorectal cancer. Clinical Genetics 81, 312–318.

Miknyoczki, S.J., Wan, W., Chang, H., Dobrzanski, P., Ruggeri, B.A., and Dionne, C.A. (2002). The Neurotrophin-Trk Receptor Axes Are Critical for the Growth and Progression of Human Prostatic Carcinoma and Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Xenografts in Nude Mice The Neurotrophin-Trk Receptor Axes Are Critical for the Growth and Progression of Huma. 1924–1931.

Mille, F., Thibert, C., Fombonne, J., Rama, N., Guix, C., Hayashi, H., Corset, V., Reed, J.C., and Mehlen, P. (2009a). The Patched dependence receptor triggers apoptosis through a DRAL-caspase-9 complex. Nature Cell Biology 11, 739–746.

Mille, F., Llambi, F., Guix, C., Delloye-Bourgeois, C., Guenebeaud, C., Castro-Obregon, S., Bredesen, D.E., Thibert, C., and Mehlen, P. (2009b). Interfering with multimerization of netrin-1 receptors triggers tumor cell death. Cell Death and Differentiation 16, 1344–1351.

Mittag, F., Kuester, D., Vieth, M., Peters, B., Stolte, B., Roessner, A., and Schneider-Stock, R. (2006). DAPK promotor methylation is an early event in colorectal carcinogenesis. Cancer Letters 240, 69–75.

Morgan, H.D., Santos, F., Green, K., Dean, W., and Reik, W. (2005). Epigenetic reprogramming in mammals. Human Molecular Genetics 14 Spec No, R47–58.

Mourali, J., Bénard, A., Lourenço, 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. *Molecular and Cellular Biology* 26, 6209–6222.

Mowla, S.J., Farhadi, H.F., Pareek, S., Atwal, J.K., Morris, S.J., Seidah, N.G., and Murphy, R. a (2001). Biosynthesis and post-translational processing of the precursor to brain-derived neurotrophic factor. *The Journal of Biological Chemistry* 276, 12660–12666.

Mueller, J.D., Bethke, B., and Stolte, M. (2002). Colorectal de novo carcinoma: a review of its diagnosis, histopathology, molecular biology, and clinical relevance. *Virchows Archiv : an International Journal of Pathology* 440, 453–460.

Mukhopadhyay, A., Jarrett, J., Chlon, T., and Kessler, J. a (2009). HeyL regulates the number of TrkC neurons in dorsal root ganglia. *Developmental Biology* 334, 142–151.

Münzel, M., Globisch, D., and Carell, T. (2011). 5-Hydroxymethylcytosine, the Sixth Base of the Genome. *Angewandte Chemie International Edition* 50, 6460–6468.

Nakagawara, A. (1998). Molecular basis of spontaneous regression of neuroblastoma: role of neurotrophic signals and genetic abnormalities. *Hum Cell*. 115–124.

Nakagawara, A. (2001). Mini review Trk receptor tyrosine kinases : A bridge between cancer and neural development. *169*, 107–114.

Naresh, A., Long, W., Vidal, G. a, Wimley, W.C., Marrero, L., Sartor, C.I., Tovey, S., Cooke, T.G., Bartlett, J.M.S., and Jones, F.E. (2006). The ERBB4/HER4 intracellular domain 4ICD is a BH3-only protein promoting apoptosis of breast cancer cells. *Cancer Research* 66, 6412–6420.

Nikoletopoulou, V., Lickert, H., Frade, J.M., Rencurel, C., Giallonardo, P., Zhang, L., Bibel, M., and Barde, Y.-A. (2010). Neurotrophin receptors TrkA and TrkC cause neuronal death whereas TrkB does not. *Nature* 467, 59–63.

Ohta, T., Numata, M., Tsukioka, Y., and Nakanuma, Y. (2001). NEUROTROPHIN-3 EXPRESSION IN HUMAN PANCREATIC CANCERS. *The Journal of Pathology* 181, 405–412.

Okano, M., Bell, D.W., Haber, D. a, and Li, E. (1999). DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* 99, 247–257.

Oswald, J., Engemann, S., Lane, N., Mayer, W., Olek, a, Fundele, R., Dean, W., Reik, W., and Walter, J. (2000). Active demethylation of the paternal genome in the mouse zygote. *Current Biology : CB* 10, 475–478.

Paradisi, A., Creveaux, M., Gibert, B., Redoulez, E., Neves, D., Cleyssac, E., Niederfellner, G., Cassier, P.A., Bernet, A., and Mehlen, P. Combining chemotherapeutic agents and netrin-1 interference potentiates cancer cell death .

Park, H.H. (2012). Structural Features of Caspase-Activating Complexes. *International Journal of Molecular Sciences* 13, 4807–4818.

Patel, T.D., Jackman, a, Rice, F.L., Kucera, J., and Snider, W.D. (2000). Development of sensory neurons in the absence of NGF/TrkA signaling in vivo. *Neuron* 25, 345–357.

- Patel, T.D., Kramer, I., Kucera, J., Niederkofler, V., Jessell, T.M., Arber, S., and Snider, W.D. (2003). Peripheral NT3 signaling is required for ETS protein expression and central patterning of proprioceptive sensory afferents. *Neuron* 38, 403–416.
- Pavicic, W., Joensuu, E.I., Nieminen, T., and Peltomäki, P. (2012). LINE-1 hypomethylation in familial and sporadic cancer. *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)* 90, 827–835.
- Pomeroy, S., Sutton, M., Goumnerova, L., and Segal, R. (1997). Neurotrophins in cerebellar granule cell development and medulloblastoma. *J Neurooncol.* 347–352.
- Potten, C.S., Booth, C., and Pritchard, D.M. (1997). Stem Cell Review The intestinal epithelial stem cell : the mucosal governor. 219–243.
- Preston, S.L., Wong, W., Chan, A.O., Poulson, R., Jeffery, R., Goodlad, R.A., Mandir, N., Elia, G., Novelli, M., Bodmer, W.F., et al. (2003). Bottom-up Histogenesis of Colorectal Adenomas : Origin in the Monocryptal Adenoma and Initial Expansion by Crypt Fission Bottom-up Histogenesis of Colorectal Adenomas : Origin in the Monocryptal Adenoma and Initial Expansion by Crypt Fission. 3819–3825.
- Rabizadeh, S., Oh, J., Zhong, L.T., Yang, J., Bitler, C.M., Butcher, L.L., and Bredesen, D.E. (1993). Induction of apoptosis by the low-affinity NGF receptor. *Science (New York, N.Y.)* 261, 345–348.
- Rajasekharan, S., and Kennedy, T.E. (2009). Protein family review The netrin protein family. 1–8.
- Rampino, N. (1997). Somatic Frameshift Mutations in the BAX Gene in Colon Cancers of the Microsatellite Mutator Phenotype. *Science* 275, 967–969.
- Ramsahoye, B.H., Biniszkiwicz, D., Lyko, F., Clark, V., Bird, a P., and Jaenisch, R. (2000). Non-CpG methylation is prevalent in embryonic stem cells and may be mediated by DNA methyltransferase 3a. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 5237–5242.
- Reichardt, L.F. (2006). Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 361, 1545–1564.
- Reik, W. (2007). Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. *Nature* 447, 425–432.
- Richmond, R.K., Sargent, D.F., Richmond, T.J., Luger, K., and Ma, A.W. (1997). Crystal structure of the nucleosome ° resolution core particle at 2 . 8 Å. 7.
- Robak, T. (2011). New nucleoside analogs for patients with hematological malignancies. *Expert Opinion on Investigational Drugs* 20, 343–359.
- Rodriguez, J., Frigola, J., Vendrell, E., Risques, R.-A., Fraga, M.F., Morales, C., Moreno, V., Esteller, M., Capellà, G., Ribas, M., et al. (2006). Chromosomal instability correlates with genome-wide DNA demethylation in human primary colorectal cancers. *Cancer Research* 66, 8462–9468.
- Rountree, M.R., Bachman, K.E., Herman, J.G., and Baylin, S.B. (2001). DNA methylation, chromatin inheritance, and cancer. *Oncogene* 20, 3156–3165.
- Royo, H., and Cavaillé, J. (2008). Non-coding RNAs in imprinted gene clusters. *Biology of the Cell / Under the Auspices of the European Cell Biology Organization* 100, 149–166.
- Rubio, C. a (2004). Serrated adenoma of the duodenum. *Journal of Clinical Pathology* 57, 1219–1221.

- Sakamoto, M., Hirata, H., Ohtsuka, T., Bessho, Y., and Kageyama, R. (2003). The basic helix-loop-helix genes *Hesr1/Hey1* and *Hesr2/Hey2* regulate maintenance of neural precursor cells in the brain. *The Journal of Biological Chemistry* 278, 44808–44815.
- Sakatani, T., Kaneda, A., Iacobuzio-Donahue, C. a, Carter, M.G., De Boom Witzel, S., Okano, H., Ko, M.S.H., Ohlsson, R., Longo, D.L., and Feinberg, A.P. (2005). Loss of imprinting of *Igf2* alters intestinal maturation and tumorigenesis in mice. *Science (New York, N.Y.)* 307, 1976–1978.
- Salvesen, G.S., and Duckett, C.S. (2002). IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 3, 401–410.
- Sancho, E., Batlle, E., and Clevers, H. (2004). Signaling pathways in intestinal development and cancer. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 20, 695–723.
- Sangiorgi, E., and Capecchi, M.R. (2008). *Bmi1* is expressed in vivo in intestinal stem cells. *Nat Genet.* 40(7), 915–920.
- Santarosa, M., and Ashworth, A. (2004). Haploinsufficiency for tumour suppressor genes: when you don't need to go all the way. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1654, 105–122.
- Sato, T., Es, J.H. Van, Snippert, H.J., Stange, D.E., Vries, R.G., Born, V. Den, Barker, N., Shroyer, N.F., Wetering, M. Van De, and Clevers, H. (2013). NIH Public Access. 469, 415–418.
- Satoh, F., Mimata, H., Nomura, T., Fujita, Y., Shin, T., Sakamoto, S., Hamada, Y., and Nomura, Y. (2001). Autocrine expression of neurotrophins and their receptors in prostate cancer. *International Journal of Urology : Official Journal of the Japanese Urological Association* 8, S28–34.
- Sawan, C., Vaissière, T., Murr, R., and Herceg, Z. (2008). Epigenetic drivers and genetic passengers on the road to cancer. *Mutation Research* 642, 1–13.
- Saxonov, S., Berg, P., and Brutlag, D.L. (2006). A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 1412–1417.
- Schlessinger, J. (2000). Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases A large group of genes in all eukaryotes encode for. 103, 211–225.
- Schneider, P., and Tschopp, J. (2000). Apoptosis induced by death receptors. *Pharm Acta Helv* 74 (2-3), 281–286.
- Schubbert, S., Shannon, K., and Bollag, G. (2007). Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. *Nature Reviews. Cancer* 7, 295–308.
- Schulze-osthoff, K., Ferrari, D., Los, M., Wesselborg, S., and Peter, M.E. (1998). Review Apoptosis signaling by death receptors. 459.
- Segal, R. a, Goumnerova, L.C., Kwon, Y.K., Stiles, C.D., and Pomeroy, S.L. (1994). Expression of the neurotrophin receptor *TrkC* is linked to a favorable outcome in medulloblastoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 12867–12871.
- Shen, L., Ahuja, N., Shen, Y., Habib, N. a, Toyota, M., Rashid, A., and Issa, J.-P.J. (2002). DNA methylation and environmental exposures in human hepatocellular carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute* 94, 755–761.

- Shih, I.M., Wang, T.L., Traverso, G., Romans, K., Hamilton, S.R., Ben-Sasson, S., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (2001). Top-down morphogenesis of colorectal tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 2640–2645.
- Siegel, R. (2006). Caspases at the crossroads of immune-cell life and death. *Nat Rev Immunol.* 6(4), 308–317.
- Siegel, R.M. (2000). Fas Preassociation Required for Apoptosis Signaling and Dominant Inhibition by Pathogenic Mutations. *Science* 288, 2354–2357.
- Strohecker, A.M., Yehiely, F., Chen, F., and Cryns, V.L. (2008). Caspase cleavage of HER-2 releases a Bad-like cell death effector. *The Journal of Biological Chemistry* 283, 18269–18282.
- Stupack, D.G., Puente, X.S., Boutsaboualoy, S., Storgard, C.M., and Cheresch, D. a (2001). Apoptosis of adherent cells by recruitment of caspase-8 to unligated integrins. *The Journal of Cell Biology* 155, 459–470.
- Sunami, E., De Maat, M., Vu, A., Turner, R.R., and Hoon, D.S.B. (2011). LINE-1 hypomethylation during primary colon cancer progression. *PloS One* 6, e18884.
- Susin, S. a, Lorenzo, H.K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B.E., Brothers, G.M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M., et al. (1999). Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397, 441–446.
- Suzuki, H., Watkins, D.N., Jair, K.-W., Schuebel, K.E., Markowitz, S.D., Chen, W.D., Pretlow, T.P., Yang, B., Akiyama, Y., Van Engeland, M., et al. (2004). Epigenetic inactivation of SFRP genes allows constitutive WNT signaling in colorectal cancer. *Nature Genetics* 36, 417–422.
- Suzuki, H., Aoyama, Y., Senzaki, K., Vincler, M., Wittenauer, S., Yoshikawa, M., Ozaki, S., Oppenheim, R.W., and Shiga, T. (2010). Characterization of sensory neurons in the dorsal root ganglia of Bax-deficient mice. *Brain Research* 1362, 23–31.
- Svensson, T., Ryden, M., Schilling, F.H., Dominici, C., Sehgal, R., Ibanez, C.F., and Kogner, P. (1997). Coexpression of mRNA for the Full-Length Neurotrophin Receptor trk-C and trk-A in Favourable Neuroblastoma. 33, 2058–2063.
- Tait, S.W.G., and Green, D.R. (2008). Caspase-independent cell death: leaving the set without the final cut. *Oncogene* 27, 6452–6461.
- Tait, S.W.G., and Green, D.R. (2010). Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 11, 621–632.
- Tamaru, H., and Selker, E.U. (2001). A histone H3 methyltransferase controls DNA methylation in *Neurospora crassa*. *Nature* 414, 277–283.
- Tauszig-Delamasure, S., and Bouzas-Rodriguez, J. (2011). Targeting neurotrophin-3 and its dependence receptor tyrosine kinase receptor C: a new antitumoral strategy. *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 15, 847–858.
- Tauszig-Delamasure, S., Yu, L.-Y., Cabrera, J.R., Bouzas-Rodriguez, J., Mermet-Bouvier, C., Guix, C., Bordeaux, M.-C., Arumäe, U., and Mehlen, P. (2007). The TrkC receptor induces apoptosis when the dependence receptor notion meets the neurotrophin paradigm. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 13361–13366.

- Taylor, S.M., and Jones, P. a (1980). Cellular differentiation, Cytidine Analogs and DNA Methylation. *International Journal of Obesity* 9 Suppl 1, 15–21.
- Tessarollo, L., Tsoulfas, P., Martin-Zanca, D., Gilbert, D.J., Jenkins, N. a, Copeland, N.G., and Parada, L.F. (1993). trkC, a receptor for neurotrophin-3, is widely expressed in the developing nervous system and in non-neuronal tissues. *Development (Cambridge, England)* 118, 463–475.
- Tessarollo, L., Tsoulfas, P., Donovan, M.J., Palko, M.E., Blair-Flynn, J., Hempstead, B.L., and Parada, L.F. (1997). Targeted deletion of all isoforms of the trkC gene suggests the use of alternate receptors by its ligand neurotrophin-3 in neuronal development and implicates trkC in normal cardiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 14776–14781.
- Thibert, C., and Fombonne, J. (2010). Mechanisms of an announced death. 2085–2091.
- 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 (New York, N.Y.)* 301, 843–846.
- Thiery, J.P. (2002). Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nature Reviews. Cancer* 2, 442–454.
- Thirlwell C, Will OC, Domingo E, Graham TA, McDonald SA, Oukrif D, Jeffrey R, Gorman M, Rodriguez-Justo M, Chin-Aleong J, Clark SK, Novelli MR, Jankowski JA, Wright NA, Tomlinson IP, L.S. (2010). Clonality assessment and clonal ordering of individual neoplastic crypts shows polyclonality of colorectal adenomas. *Gastroenterology*. 138(4), 1441–1454.
- Thompson, E.W., and Haviv, I. (2011). The social aspects of EMT-MET plasticity. *Nature Medicine* 17, 1048–1049.
- Thorburn, A. (2004). Death receptor-induced cell killing. *Cellular Signalling* 16, 139–144.
- Todaro, M., Alea, M.P., Di Stefano, A.B., Cammareri, P., Vermeulen, L., Iovino, F., Tripodo, C., Russo, A., Gulotta, G., Medema, J.P., et al. (2007). Colon cancer stem cells dictate tumor growth and resist cell death by production of interleukin-4. *Cell Stem Cell* 1, 389–402.
- Todaro, M., Francipane, M., Medema, J., and Stassi, G. (2010). Colon cancer stem cells: promise of targeted therapy. *Gastroenterology*. 138(6), 2151–2162.
- Tollefsbol, T., E. (2011). *Handbook of Epigenetic The New Molecular and Medical Genetics*. Elsevier.
- Tschopp, J., Martinon, F., and Burns, K. (2003). NALPs: a novel protein family involved in inflammation. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 4, 95–104.
- Tulasne, D., Deheuninck, J., Calheiros, F., Lamballe, F., Ji, Z., Leroy, C., Puchois, E., Moumen, A., Maina, F., Lourenc, F.C., et al. (2004). Proapoptotic Function of the MET Tyrosine Kinase Receptor through Caspase Cleavage Proapoptotic Function of the MET Tyrosine Kinase Receptor through Caspase Cleavage.
- Vaissière, T., Sawan, C., and Herceg, Z. (2008). Epigenetic interplay between histone modifications and DNA methylation in gene silencing. *Mutation Research* 659, 40–48.
- Valsesia-Wittmann, S., Magdeleine, M., Dupasquier, S., Garin, E., Jallas, A.-C., Combaret, V., Krause, A., Leissner, P., and Puisieux, A. (2004). Oncogenic cooperation between H-Twist and N-Myc overrides failsafe programs in cancer cells. *Cancer Cell* 6, 625–630.

- Varela, I., Tarpey, P., Raine, K., Huang, D., Ong, C.K., Davies, H., Jones, D., Lin, M., Teague, J., Bignell, G., et al. (2011). Europe PMC Funders Group Exome sequencing identifies frequent mutation of the SWI / SNF complex gene PBRM1 in renal carcinoma. *469*, 539–542.
- Veigl, M.L., Kasturi, L., Olechnowicz, J., Ma, a H., Lutterbaugh, J.D., Periyasamy, S., Li, G.M., Drummond, J., Modrich, P.L., Sedwick, W.D., et al. (1998). Biallelic inactivation of hMLH1 by epigenetic gene silencing, a novel mechanism causing human MSI cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *95*, 8698–8702.
- Vignali, M., Hassan, A.H., Neely, K.E., and Workman, J.L. (2000). MINIREVIEW ATP-Dependent Chromatin-Remodeling Complexes. *20*.
- Visvader, J.E. (2011). Cells of origin in cancer. *Nature* *469*, 314–322.
- Visvader, J.E., and Lindeman, G.J. (2008). Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nature Reviews. Cancer* *8*, 755–768.
- Volgelstein, B. (1988). Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med.* *319*(9), 525–532.
- Waddington, C. (1942). CANALIZATION OF DEVELOPMENT AND THE INHERITANCE OF ACQUIRED CHARACTERS. *Nature* *150*, 563–565.
- Walensky, L.D., and Gavathiotis, E. (2011). BAX unleashed: the biochemical transformation of an inactive cytosolic monomer into a toxic mitochondrial pore. *Trends in Biochemical Sciences* *36*, 642–652.
- 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. *Biochemical and Biophysical Research Communications* *370*, 594–598.
- Wang, L.-L., Zhang, Z., Li, Q., Yang, R., Pei, X., Xu, Y., Wang, J., Zhou, S.-F., and Li, Y. (2009). Ethanol exposure induces differential microRNA and target gene expression and teratogenic effects which can be suppressed by folic acid supplementation. *Human Reproduction (Oxford, England)* *24*, 562–579.
- Weeraratna, A., Arnold, J., George, D., DeMarzo, A., and Isaacs, J. (2000). Rational basis for Trk Inhibition therapy for prostate cancer. *The Prostate* *45*, 140–148.
- Weng, C., Li, Y., Xu, D., Shi, Y., and Tang, H. (2005). Specific cleavage of Mcl-1 by caspase-3 in tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis in Jurkat leukemia T cells. *The Journal of Biological Chemistry* *280*, 10491–10500.
- Wiedemann, S.M., Mildner, S.N., Bönisch, C., Israel, L., Maiser, A., Matheisl, S., Straub, T., Merkl, R., Leonhardt, H., Kremmer, E., et al. (2010). Identification and characterization of two novel primate-specific histone H3 variants, H3.X and H3.Y. *The Journal of Cell Biology* *190*, 777–791.
- Xia, W., Nagase, S., Montia, A.G., Kalachikov, S.M., Su, T., Memeo, L., Hibshoosh, H., and Parsons, R. (2008). BAF180 is a critical regulator of p21 induction and a tumor suppressor mutated in breast cancer. *Cancer Research* *68*, 1667–1674.
- Yang, Q., Mori, I., Shan, L., Nakamura, M., Nakamura, Y., Utsunomiya, H., Yoshimura, G., Suzuma, T., Tamaki, T., Umemura, T., et al. (2001). Biallelic inactivation of retinoic acid receptor beta2 gene by epigenetic change in breast cancer. *The American Journal of Pathology* *158*, 299–303.

- Yang, Q.-H., Church-Hajduk, R., Ren, J., Newton, M.L., and Du, C. (2003). Omi/HtrA2 catalytic cleavage of inhibitor of apoptosis (IAP) irreversibly inactivates IAPs and facilitates caspase activity in apoptosis. *Genes & Development* *17*, 1487–1496.
- Yang, X., Chang, H.Y., and Baltimore, D. (1998). Autoproteolytic activation of pro-caspases by oligomerization. *Molecular Cell* *1*, 319–325.
- Yano, H., and Chao, M. (2000). Neurotrophin receptor structure and interactions. *Pharm Acta Helv.* *74*, 253–260.
- Yoshida, K., and Miki, Y. (2010). The cell death machinery governed by the p53 tumor suppressor in response to DNA damage. *Cancer Science* *101*, 831–835.
- Zamurovic, N., Cappellen, D., Rohner, D., and Susa, M. (2004). Coordinated activation of notch, Wnt, and transforming growth factor-beta signaling pathways in bone morphogenic protein 2-induced osteogenesis. Notch target gene Hey1 inhibits mineralization and Runx2 transcriptional activity. *The Journal of Biological Chemistry* *279*, 37704–37715.
- Zardo, G., Fazi, F., Travaglini, L., and Nervi, C. (2005). Dynamic and reversibility of heterochromatic gene silencing in human disease. *15*, 679–690.
- Zheng, W.-H., Kar, S., and Quirion, R. (2002). FKHL1 and its homologs are new targets of nerve growth factor Trk receptor signaling. *Journal of Neurochemistry* *80*, 1049–1061.
- Zhou, J., Fan, J.Y., Rangasamy, D., and Tremethick, D.J. (2007). The nucleosome surface regulates chromatin compaction and couples it with transcriptional repression. *Nature Structural & Molecular Biology* *14*, 1070–1076.
- Zingg, J.M., and Jones, P. a (1997). Genetic and epigenetic aspects of DNA methylation on genome expression, evolution, mutation and carcinogenesis. *Carcinogenesis* *18*, 869–882.

