



HAL
open science

Les facteurs de transcription MAF dans l'oncogenèse : implication de NRL dans le médulloblastome

Alexandra Garancher

► **To cite this version:**

Alexandra Garancher. Les facteurs de transcription MAF dans l'oncogenèse : implication de NRL dans le médulloblastome. Cancer. Université Paris Sud - Paris XI, 2014. Français. NNT : 2014PA112103 . tel-01249547

HAL Id: tel-01249547

<https://theses.hal.science/tel-01249547>

Submitted on 4 Jan 2016

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.

UNIVERSITE PARIS-SUD

ÉCOLE DOCTORALE : Gènes, Génomes, Cellules

Laboratoire de Signalisation normale et pathologique :

De l'embryon aux thérapies innovantes des cancers

DISCIPLINE : Biologie

THÈSE DE DOCTORAT

Soutenue le 16 juin 2014

par

Alexandra GARANCHER

***LES FACTEURS DE TRANSCRIPTION MAF DANS L'ONCOGENESE :
IMPLICATION DE NRL DANS LE MEDULLOBLASTOME***

Directeur de thèse : Celio POUPONNOT CR1 (Institut Curie, Orsay)

Composition du jury :

Président du jury : Pierre CAPY Professeur (Université Paris Sud 11, Gif-sur-Yvette)

Rapporteurs : François VALLETTE DR1 (Centre de Recherche en Cancérologie Nantes-Angers)

Marie-Pierre JUNIER DR2 (Neuroscience Paris Seine/UPMC)

Examineurs : Isabelle DUSANTER-FOURT DR2 (Institut Cochin, Paris)

Stéphane ANSIEAU CR1 (Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon)

REMERCIEMENTS

La thèse est un travail de longue haleine qui ne peut aboutir sans la collaboration de nombreuses personnes. Je tiens à remercier tous ceux qui ont contribué à cette thèse de près ou de loin. Telle une petite chenille qui devient papillon, je sors de ma thèse, grandie et prête à prendre mon envol. Merci à tous !

Je remercie le professeur Pierre Capy d'avoir accepté de présider mon jury de thèse ainsi que le Dr Marie-Pierre Junier et le Dr François Vallette pour en avoir assuré le rôle de rapporteur. Merci aussi aux Dr Isabelle Dusanter-Fourt et Dr Stéphane Ansieau pour leur rôle d'examineurs.

Merci au labo des Bisounours passé et présent...

A mon arrivée au laboratoire, j'étais extrêmement timide... je tiens à tous vous remercier d'avoir vu au-delà et permis de me sentir au laboratoire comme à la maison !

Merci Alain de m'avoir nommé responsable balai ! Plus sérieusement merci de m'avoir accueillie au sein de ton laboratoire, pour tes encouragements et tes conseils durant ces dernières années.

Merci Celio,

Un gigantissime merci pour ton « coaching » tout au long de ma thèse... je ne sais pas si j'aurais pu avoir un meilleur Chef, à la fois Humain et Scientifiquement impressionnant.

Merci pour la correction de ce manuscrit, pour m'avoir permis d'acquérir une maturité scientifique, pour tout ce que j'ai appris tant sur le plan expérimental que théorique. Je te remercie également pour les différentes rencontres que tu m'as permis de faire... Merci d'avoir fait de ma thèse 4 années aussi « riches » !

Merci d'avoir su composé avec mon caractère pas toujours facile, pour tes encouragements, la confiance que tu m'accordes, ton dynamisme et la patience dont tu as dû faire preuve...

Peu de directeur de thèse ont leur « Fan club », c'est ton cas... Merci pour tout !

Merci Nath pour ta présence et ton encadrement... Depuis mon arrivée en stage de master 2, tu as été comme une grande sœur de labo, à travers tes nombreux conseils, tout ce que tu m'as appris, tes encouragements, et les discussions scientifiques ou non... Au cours de ma thèse, on m'a souvent taquiné sur le fait de placer mon Chef sur un piédestal, mais en fait tu y es aussi... MERCI!

Merci les filles, les copines !!!

Je vous remercie pour vos conseils, votre soutien, votre écoute, votre dynamisme, les « pauses café », votre addiction au sucre (chocolat, crème de marron, coca, bonbons !) et les délires... Je pensais qu'un univers de fille laissait présager de « crêpages de chignon » en tout genre,

mais vous m'avez montré le contraire ! MERCI pour l'ensemble de ces 4 années, s'il existait une palme d'or des collègues, elle serait pour vous...

Agathe, merci pour tes encouragements et paradoxalement pour ton mauvais caractère, je crois le mien n'est pas mal non plus ! Même si tu n'es plus au labo et que la recherche est derrière toi, tu as laissé ton empreinte et reste l'un des bisounours, le rose ?! Céline, notre LittleB, merci d'être une super voisine de droite (en même temps je n'en ai qu'une), d'avoir relu ce manuscrit et surtout merci pour ton écoute et les papotages/craquages de fin de journée. Coralie, notre petite châtaigne noire, merci d'être tellement optimiste (tout mon contraire !), ce qui m'a beaucoup aidé à relativiser dans mes minis galères de thèse. Jessy, la petite nouvelle, bien que l'on se connaisse pas beaucoup, j'ai l'impression que tu as le potentiel du bisounours ! Laure, merci d'être un « puit de science » et de m'en avoir fait bénéficier. Mag, notre Gremlins de 17h, merci de ton aide, particulièrement au moment de la rédaction de ce manuscrit, de ta patience et il en a fallu ! Je sais que j'ai beaucoup de mal à déléguer, mais j'y travaille, MERCI pour tout ! Morgane, merci pour ta « fraîcheur », ton enthousiasme et même ton « insolence » qui te vaut le titre de 1^{ère} stagiaire (j'aurais pu te confectionner une écharpe mais je manque un peu de temps !) Plus sérieusement, je te souhaite de rester pour ta thèse et de t'éclater autant que moi ! Nim, merci pour tes cours d'anglais improvisés, ça rentre toujours mieux lorsque l'on papote ! Sab, merci d'être un peu comme une maman au labo, toujours de bons conseils, souvent bien au-delà de la Science.

Merci aux personnes que j'ai pu côtoyer au cours de mes études et de ma thèse...

Un grand merci à tous les membres de l'Institut Curie, avec lesquels j'ai pu travailler... Je remercie l'ensemble des membres de l'Unité 1021, au sein de laquelle j'ai effectué ma thèse. Plus particulièrement, je remercie Véro, notre secrétaire, pour toute l'aide que tu nous apporte au quotidien... Merci également à une autre Véro, pour la relecture de ce manuscrit et pour tout ton soutien. Julie, rebaptisée « rilette » (oui oui on s'en souviendra !) et membre de la MAFIA antonienne, merci d'être aussi rigolote, merci à l'anciennement club gossip du L2 pour l'accompagnement durant les heures passées en culture cellulaire.

Je remercie également les personnes avec lesquelles, j'ai collaboré, plus spécialement Franck Bourdeault, Wilfrid Richer, Marie-Christine Lienafa, Nathalie Cassoux et l'ensemble des membres de l'équipe d'Olivier Ayrault.

Merci aux membres de mon comité de thèse, qui se sont rendus disponibles chaque année...

Un énorme MERCI, à Fabrice pour ton enseignement en microscopie, à Sophie pour avoir « désacralisé » l'histologie, à Charlène pour avoir comblé mon ignorance en cytométrie, à Elodie, Christophe, Fred, Françoise et Virginie pour leur aide à l'animalerie avec les pépettes... Bien que je ne puisse citer tout le monde, je vous remercie tous énormément !

Un grand merci à ceux qui ont influencé plus ou moins directement mon goût pour les sciences du vivant et mon envie de faire de la Recherche. Merci au Dr Ameyar-Zazoua et Mouloud Souidi pour m'avoir fait découvrir le monde du laboratoire. Merci également à M. et Mme Perasso ainsi qu'à Mme Bonnefond.

Merci à mes amis

Merci à mes 2 chéries : Val et Débo ! On a toutes les trois commencé nos études supérieures ensemble et même si l'on s'est finalement destiné à des carrières différentes, je vous remercie pour votre présence depuis 10 ans ! Ca aurait été tellement facile de nous éloigner... Depuis toutes ces années que vous me « supporté », je vous remercie pour votre grain de folie et tout les moments que l'on passe ensemble et qui me changent les idées! Peu importe où on sera et les chemins que nous emprunterons, je sais que l'on pourra toujours compter les unes sur les autres ! Je vous aime fort ! MERCI !

Merci Kamel... un jour mon grand-père m'a dit que les vrais amis se reconnaissent à leur présence en toutes circonstances... Bien que l'on se soit éloigné, je ne pouvais pas ne pas te remercier ici ... Tu m'as soutenu dans les moments les plus difficiles que j'ai eu à vivre. A cette époque j'aurais pu tout laisser tomber, notamment mes études, mais tu as été là ... Alors je te remercie pour ton soutien indéfectible et d'avoir indirectement contribué à ma thèse !

Merci au clan magistère,

Merci à Laetitia et Nina pour ces moments 100% fille! Merci à Steeve, Pierre-Louis, Anne-Clémence, Quentin, Nicolas, Yoann, Marianne pour les soirées, les diners. Intégrer le magistère est l'une des meilleures décisions que j'ai pu prendre... Parmi vous j'ai repris un peu confiance en moi et je vous en remercie infiniment! Comme une famille avec des hauts et des bas, vous êtes toujours là...

Merci les amis : Stephanie et Jérémy, Thibault, Christelle, Mariette, Annabelle et Paul, Anne-Sophie et Nicolas, Audrey... Je vous ai rencontré à des moments différents, et tous avez été présents durant cette thèse, alors MERCI pour la vie en dehors du labo, les soirées, les délires, les sorties!

Merci à ma famille

Merci à mes grand-parents, pour m'avoir inculqué le goût du travail, et m'avoir chacun à votre manière rendu plus forte !

Merci à mes parents,

Tous les jeunes ne débutent pas leur vie avec la même chance... outre de m'avoir mise au monde, je n'en serais pas là sans vous !

Pour avoir financé toutes mes études et m'avoir donné l'opportunité de faire ce que j'aime, pour votre présence pendant la rédaction de ce manuscrit, pour votre soutien et vos conseils durant toutes ces années, pour avoir séché mes larmes dans mes échecs et la fierté dans vos yeux dans mes réussites, pour votre amour inconditionnel, pour les années à venir, pour tout cela, je vous remercie du fond de mon cœur !

Merci à mon grand-frère Michaël,

Je te remercie tout d'abord d'avoir pris le temps de lire et d'apporter tes corrections à ce manuscrit. Beaucoup de choses nous opposent et pourtant on est complémentaires... MERCI

mon grand-frère de me comprendre aussi bien, ton écoute, ta bienveillance et ton amour fraternels, ton soutien indéfectible et tes nombreux conseils.

Merci mon Choupi, alias mon bébé cœur... pour ta ptite bouille qui me fait sourire tout les jours...

Merci à mon amoureux,

Certains nous ont dis que si notre histoire survivait à nos thèses, elle durerait pour la vie. Après 4 années de thèse, je comprends mieux et elle a survécue, ce sera pour la vie ! Que ferais-je sans toi... Merci de me supporter au quotidien (ce n'est pas toujours simple !), de me faire relativiser, de m'apaiser, de me faire rire, d'être mon « anti-stress » à MOI ! Merci pour ton soutien, tes conseils et ta compréhension... Pour reprendre une chanson, sache que je...sache le !

SOMMAIRE

SUMMARY	5
RESUME	6
LISTE DES ILLUSTRATIONS	7
LISTE DES ABREVIATIONS	8
PREAMBULE	10
INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	13
1. LES PROTEINES MAF	14
1.1. <i>Les membres de la famille MAF</i>	15
1.2. <i>Les domaines et leur fonction</i>	15
1.2.1. <i>Domaine de liaison à l'ADN</i>	16
1.2.2. <i>Domaine de transactivation</i>	17
1.3. <i>Liaison à l'ADN des protéines MAF</i>	18
1.3.1. <i>Les sites de reconnaissance des protéines MAF (MARE)</i>	18
1.3.2. <i>Dimérisation des protéines MAF</i>	19
1.4. <i>Dualité du rôle des protéines Maf : différenciateur/oncogène</i>	21
1.4.1. <i>Rôle des protéines MAF dans les processus de différenciation</i>	21
1.4.2. <i>Les protéines MAF dans l'oncogénèse</i>	25
1.5. <i>Activité transcriptionnelle des protéines MAF</i>	28
1.5.1. <i>Régulation post-traductionnelle de l'activité transactivatrice des protéines MAF par modifications post-traductionnelles</i>	28
1.5.2. <i>Activité transactivatrice des protéines MAF et interaction avec leurs partenaires.</i>	
31	
2. NEURAL RETINA LEUCINE ZIPPER (NRL)	32
2.1. <i>Expression de NRL</i>	32
2.1.1. <i>Profil d'expression de NRL</i>	32
2.1.2. <i>Régulation de l'expression de NRL</i>	32
2.2. <i>Rôle physiologique</i>	33
2.2.1. <i>Rôle majeur dans la différenciation d'un sous-type de photorécepteurs</i>	33
2.2.2. <i>Régulation de l'activité de NRL</i>	35
2.3. <i>Mutations de NRL associées à des pathologies</i>	36
2.3.1. <i>Mutation gain de fonction de NRL</i>	36
2.3.2. <i>Mutation perte de fonction de NRL</i>	36
3. LE MEDULLOBLASTOME	37
3.1. <i>Généralités</i>	37
3.2. <i>Les sous-groupes de MB</i>	40
3.2.1. <i>Le groupe WNT</i>	41

3.2.2. Le groupe HH (Sonic Hedgehog).....	45
3.2.3. Le groupe 4.....	50
3.2.4. Le groupe 3.....	53
3.3. <i>Cellule souche tumorale et MB</i>	58
4. APOPTOSE ET CANCER.....	61
4.1. <i>Les voies de l'apoptose</i>	61
4.1.1. Voie extrinsèque ou voie des récepteurs de mort.....	61
4.1.2. Voie intrinsèque ou voie mitochondriale.....	62
4.2. <i>La famille des protéines BCL-2 et cancer</i>	64
4.2.1. Les membres de la famille Bcl-2 et leur activité.....	65
4.2.2. Mécanismes d'action des protéines de la famille BCL-2.....	66
4.3. <i>Dérégulation de l'apoptose dans l'oncogénèse</i>	69
4.4. <i>Ciblage des protéines anti-apoptotiques BCL-2 en thérapeutique</i>	70
RESULTATS.....	73
1. IMPLICATION DE LA PHOSPHORYLATION DES MAF PAR GSK3 DANS LA CARCINOGENESE DU MYELOME MULTIPLE.....	74
1.1. <i>Contexte et objectifs du travail</i>	74
1.2. <i>Régulation des protéines MAF par phosphorylation induite par GSK3 et ses conséquences fonctionnelles dans le myélome multiple</i>	75
2. IMPLICATION DU FACTEUR DE TRANSCRIPTION NRL DONT L'EXPRESSION EST SPECIFIQUE DES PHOTORECEPTEURS DANS LA CARCINOGENESE DE MEDULLOBLASTOMES AGRESSIFS.....	78
2.1. <i>Contexte et objectifs du travail</i>	78
2.2. <i>Identification du rôle oncogénique de NRL dans le médulloblastome</i>	79
2.3. <i>Etude du rôle oncogénique de NRL dans les médulloblastomes de groupe 3</i>	80
DISCUSSION.....	83
1. EXPRESSION DU FACTEUR DE TRANSCRIPTION SPECIFIQUE DES PHOTORECEPTEURS NRL DANS LE MB DE GROUPE 3.....	85
1.1. <i>Régulation de l'expression de NRL dans le MB</i>	85
1.1.1. Implication des facteurs OTX2, CRX et ROR β	85
1.1.2. Implication de la voie Activine.....	86
1.2. <i>Régulation épigénétique de l'expression de NRL</i>	87
1.2.1. La protéine SMARCA4.....	87
1.2.2. Altération du niveau d'acétylation des histones.....	87
1.2.3. Altération du niveau de méthylation.....	88
2. ACTIVITE ONCOGENIQUE DE C-MAF ET NRL RESPECTIVEMENT DANS LE MYELOME MULTIPLE ET LE MEDULLOBLASTOME.....	90
2.1. <i>Le facteur de transcription NRL est un oncogène atypique</i>	90

2.2. <i>L'activité oncogénique des protéines MAF est régulée par des modifications post-traductionnelles.....</i>	91
2.3. <i>Coopération de l'oncogène MYC et des protéines MAF dans les cancers.....</i>	93
3. LES PROTEINES ANTI-APOPTOTIQUES BCL, DE NOUVELLES CIBLES DANS LE TRAITEMENT DE TUMEURS RESISTANTES	95
CONCLUSION GENERALE.....	96
<i>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</i>	97
<i>ANNEXE</i>	119
FAIBLE PENETRANCE DANS LE RETINOBLASTOME: IMPLICATION DU GENE MED4.....	120
1. <i>Contexte et objectif du travail</i>	120
2. <i>Identification de gènes candidats</i>	122
3. <i>Validation fonctionnelle du gène MED4</i>	122
<i>Références bibliographiques.....</i>	124

SUMMARY

TITLE : MAF TRANSCRIPTION FACTORS IN ONCOGENESIS: INVOLVEMENT OF NRL IN MEDULLOBLASTOMA

MAF (MusculoAponeurotic Fibrosarcoma) transcription factors are involved in terminal differentiation during normal development, and also in oncogenesis. A functional uncoupling is observed between these two functional activities. Indeed, target genes involved in cancer or terminal differentiation look different. The oncogenic activity of MAF proteins is dependent on the cellular context. Thus, it was suggested that they exert their oncogenic activity in tissues where they are not normally expressed. In addition, their transforming ability is regulated by phosphorylation. My work focused on the oncogenic role of these proteins by studying these two aspects. I identified the oncogenic role of NRL, a member of the MAF family in Medulloblastoma and I studied the regulation by phosphorylation of MAF in Multiple Myeloma.

The oncogenic activity of the transcription factor NRL, known for its role in the terminal differentiation of a cell type in the retina, has never been established. While NRL is not expressed in the healthy cerebellum, transcriptome studies showed that NRL is overexpressed in an aggressive subgroup of medulloblastoma, a pediatric tumor of the cerebellum. I showed for the first time that NRL is an oncogene. NRL is directly involved in the carcinogenesis of medulloblastoma, protecting cells from apoptosis through regulation of an anti-apoptotic member of the BCL family, BCL-XL. Inhibition of the protein BCL could be a potential therapeutic strategy for medulloblastoma with a poor prognosis and resistant to conventional therapies.

In the laboratory, I also participated in a project which focused on the regulation of the oncogenic activity of transcription factors, MAF, in rarely curable multiple myeloma. This work establishes that the oncogenic activity of two MAF members, MAFB and c-MAF, are regulated by phosphorylation-induced Ser/Thr kinase GSK3. Phosphorylation of transcription factors MAF increases their oncogenic activity and paradoxically induces their degradation by the proteasome. This work has identified a potential mechanism of resistance of these tumors providing a new therapeutic approach, based on the inhibition of MAF protein phosphorylation.

RESUME

Les facteurs de transcription de la famille MAF sont impliqués d'une part au cours du développement dans des processus de différenciation terminale et d'autre part dans la carcinogenèse. Un découplage fonctionnel est observé. En effet, les gènes cibles mis en jeu au cours des processus cancéreux et de différenciation terminale semblent différents. L'activité oncogénique des protéines MAF dépend du contexte cellulaire. Ainsi, il a été proposé qu'elles exercent leur activité oncogénique dans des tissus où elles ne sont pas exprimées normalement. De plus, leur pouvoir transformant est régulé par phosphorylation. Mon travail de thèse a porté sur le rôle oncogénique de ces protéines en étudiant ces deux aspects. J'ai identifié le rôle oncogénique de NRL, un membre de la famille MAF, dans le Médulloblastome et j'ai étudié la régulation par phosphorylation des MAF dans le Myélome Multiple.

L'activité oncogénique du facteur de transcription NRL, connu pour son rôle dans la différenciation terminale d'un type cellulaire de la rétine, n'avait jamais été établie. Alors que NRL n'est pas exprimé dans le cervelet sain, des études de transcriptome ont montré que NRL est surexprimé dans un sous-groupe agressif de médulloblastome, une tumeur pédiatrique du cervelet. J'ai montré pour la première fois que NRL est un oncogène. Il participe directement à la carcinogenèse de médulloblastomes, en protégeant les cellules de l'apoptose, à travers la régulation d'un membre anti-apoptotique de la famille BCL, BCL-XL. L'inhibition des protéines BCL pourrait constituer une stratégie thérapeutique potentielle dans des Médulloblastomes de mauvais pronostic et résistants aux traitements classiques.

Au sein du laboratoire, un projet, auquel j'ai participé, a porté sur la régulation de l'activité oncogénique des facteurs de transcription MAF, dans des Myélomes Multiples, de mauvais pronostic. Ce travail établit que l'activité oncogénique de deux membres de la famille MAF, MAFB et c-MAF, est régulée par phosphorylation induite par la Ser/Thr kinase GSK3. La phosphorylation des facteurs de transcription MAF augmente leur activité oncogénique et paradoxalement induit leur dégradation par le protéasome. Ce travail a permis d'identifier un mécanisme de résistance potentiel de ces tumeurs et de proposer une nouvelle approche thérapeutique, basée sur l'inhibition de la phosphorylation des protéines MAF.

LISTE DES ILLUSTRATIONS

FIGURE 1 : LES PROTEINES DE LA SUPERFAMILLE AP-1	14
FIGURE 2 : STRUCTURE SCHEMATIQUE DES DIFFERENTS MEMBRES DE LA FAMILLE MAF.....	15
FIGURE 3 : LIAISON DES FACTEURS DE TRANSCRIPTION MAF A L'ADN	18
FIGURE 4 : STRUCTURE D'UN DIMERE DE FACTEURS DE TRANSCRIPTION MAF LIE A L'ADN....	20
TABLEAU 1 : TABLEAU RECAPITULATIF DU ROLE PHYSIOLOGIQUE DES GRANDS MEMBRES DE LA FAMILLE MAF.....	22
FIGURE 5 : MODELE DU ROLE DES PROTEINES MAF DANS LES CANCERS.....	27
FIGURE 6 : REGULATION POST-TRADUCTIONNELLE DES GRANDS MEMBRES MAF SUR DES RESIDUS CONSERVES.....	31
FIGURE 7 : MODELE DE LA REGULATION DE L'EXPRESSION DE NRL PAR LES FACTEURS DE TRANSCRIPTION OTX2, CRX ET ROXB	33
FIGURE 8 : ROLE CENTRAL DU FACTEUR DE TRANSCRIPTION NRL DANS LA DIFFERENCIATION DES PHOTORECEPTEURS.....	34
FIGURE 9 : LOCALISATION DU MB AU NIVEAU DU CERVELET	37
FIGURE 10 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE L'ORGANISATION DU CERVELET	38
FIGURE 11 : ORIGINE DES SOUS-GROUPES DE MB	39
FIGURE 12 : CLASSIFICATION DES MB	41
FIGURE 13 : SCHEMA SIMPLIFIE DE LA VOIE WNT	44
FIGURE 14 : SCHEMA SIMPLIFIE DE LA VOIE HH.....	47
FIGURE 15 : SCHEMA SIMPLIFIE DE LA VOIE PI3K/AKT/MTOR	49
FIGURE 16 : SCHEMA SIMPLIFIE DE LA VOIE CANONIQUE TGFB/ACTIVINE.....	56
FIGURE 17 : BMI UN ACTEUR CLE DE LA MAINTENANCE DE L'ETAT SOUCHE DES CELLULES. .	60
FIGURE 18 : LES DIFFERENTES VOIES DE L'APOPTOSE	64
FIGURE 19 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES MEMBRES DE LA FAMILLE BCL-2	65
FIGURE 20 : REGULATION DE L'APOPTOSE PAR LES MEMBRES DE LA FAMILLE BCL-2	67
TABLEAU 2 : LES INHIBITEURS DES PROTEINES DE LA FAMILLE BCL-2	72
FIGURE 21 : REGULATION HYPOTHETIQUE DE L'EXPRESSION DE NRL DANS LE MB.....	90
FIGURE 22 : NOUVEAU MODELE DU ROLE DES PROTEINES MAF DANS LES CANCERS	94
FIGURE 23 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA STRUCTURE DU COMPLEXE MEDIATEUR.....	122

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : Acide DésoxyriboNucléique
ADRP: Autosomal Dominant RP
AP-1: Activating Protein 1
APC: Adenomatous Polyposis Coli
ARE: Antioxidant Response Element
ARN: Acide Ribo Nucléique
ARRP: Autosomal Recessif RP
ATF: Activating Transcription Factor
BCL: B-cell Lymphoma
BET: bromodomain and extra-terminal
b-ZIP: Basic-Leucine Zipper
CAD: Caspase Activated DNase
CBP: CREB Binding Protein
CCND2: Cycline D2
CDK: Cyclin-Dependent Kinase
ChIP: Chromatin ImmunoPrecipitation
CNC: Cap'N'Collar
CPM: Cellule Post-Mitotique
CPR: Cellule Pluripotente de la Rétine
CREB: C-AMP Response Element-binding protein
CRX : Cone-Rod homeobox
CSC: cellule souche cancéreuse
CSN: cellule souche neurale
CRE: cAMP Responsive Element
CREB: cAMP Responsive Element Binding
DED: Death Effector Domain
DSH: Dishevelled
EGF: Epidermal Growth Factor
EGL: External Granular Layer
EHR: Extended Homology Region
EIM: Espace Inter-Membranaire
FGF: Fibroblast Growth Factor
GCP: Granular Cell Progenitor
GSK3 : Glycogen Synthase Kinase 3
HAT: Histone Acetyl Transferase
HDAC: Histone DeAcetylase
HDMT: Histone DéMéthylTransfêrase
HH: Hedgehog
HMT: Histone MéthylTransfêrase
IAP: Inhibitor of Apoptosis
ICAD: Inhibitor of CAD
IGF: Insuline-like Growth Factor
IGL: Internal Granular Layer
IL: Interleukine
IRM: Imagerie à Résonnance Magnétique

JNK: Jun amino-terminal kinase
KO: Knock-out
LC/A: Large Cell/Anaplasique
LRLP: Lower Rhombic Lip Progenitor
MAF: Musculo Aponeurotic Fibrosarcoma
MAPK: Microtubule Associated Protein Kinase
MARE: MAF Responsive Element
MB: medulloblastoma
MM: myeloma multiple
MME: Membrane Mitochondriale externe
MPNST: Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumor
NF-E2: Nuclear Factor Erythroid derived 2
NF- κ B: nuclear factor-kappa B
NR2E3: Nuclear Receptor subfamily 2, group E, member 3
NRL: Neural Retina Leucine zipper
OTX2: Orthodenticle Homeobox 2
PCR: Polymerase Chain Reaction
PDK1: Phosphoinositide Dependent Protein Kinase 1
PI3K: Phosphoinositide-3-Kinase
PNET: tumeurs primitives neuro-ectodermiques
PTCH: Patched
RB: Retinoblastoma
RHO: Rhodopsine
RP: Rétinite Pigmentaire
ROR: RAR-related Orphan Receptor
shARN: small hairpin ARN
SHH: Sonic Hedgehog
SMO: Smoothened
TBP: TATA Binding Protein
TCF/LEF: T-cell Factor/Lymphoid Enhancer Factor
TGF: Transforming Growth Factor
TH2: T Helper 2
TNF: Tumor Necrosis Factor
TRADD : TNFR1 Associated Death Domain protein
TRE: T-MARE
VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor
WNT: Wingless integration site

PREAMBULE

Le cancer est l'une des dix premières causes de mortalité mondiale. En 2012, 14 millions de nouveaux cas de cancer ont été détectés et environ 8 millions de patients sont décédés (Communiqué de l'Organisation Mondiale de la Santé, décembre 2013). Au cours de ces dernières décennies, le Cancer est devenu un enjeu majeur de santé publique.

Les approches thérapeutiques développées actuellement en cancérologie s'attachent à cibler les événements oncogéniques chez un patient donné. Ceux-ci induisent d'importantes modifications des programmes d'expression génique conférant aux cellules des propriétés particulières qui participent à l'établissement du phénotype tumoral. Les facteurs de transcription, par leur capacité à modifier l'expression des gènes, sont des acteurs clés de ce processus. Ils peuvent être la cible directe de ces événements mutationnels, ou peuvent être impliqués indirectement, en aval de ces événements oncogéniques. Une meilleure compréhension de la régulation de l'activité des facteurs de transcription ainsi que des voies de signalisation impliquées apparaît à présent cruciale et pourrait permettre *in fine* de développer de nouvelles approches thérapeutiques plus efficaces et plus ciblées.

Les travaux menés au laboratoire s'inscrivent dans ce cadre. Le laboratoire s'intéresse aux facteurs de transcription de la famille MAF, des protéines de la famille AP-1, dont certains membres possèdent une activité oncogénique bien établie. Néanmoins, ce sont des oncogènes atypiques. En effet, il existe un découplage entre leurs rôles physiologiques où ils sont impliqués dans des processus de différenciation terminale de tissus spécifiques et leur activité oncogénique. Les travaux menés au laboratoire portent particulièrement sur cette dualité fonctionnelle:

- Les modifications post-traductionnelles des facteurs de transcription MAF régulent leur activité oncogénique. Une étude de l'équipe (Rocques et al. 2007) a mis en évidence que MAFA, un membre de cette famille, est phosphorylé par la sérine/thréonine kinase GSK3 et que ces phosphorylations sont nécessaires pour l'activité transformante de MAFA.
- Les facteurs de transcription MAF exercent leur activité oncogénique uniquement lorsqu'ils sont exprimés de manière ectopique dans un tissu donné. Leur activité oncogénique dépend très fortement du contexte cellulaire (Pouponnot et al. 2006).

Le travail de recherche que j'ai réalisé au cours de ma thèse s'est intéressé à ces deux aspects. J'ai participé à un projet qui a permis de mettre en évidence l'importance des phosphorylations des facteurs de transcription c-MAF et MAFB par GSK3, pour la régulation de leur activité oncogénique dans le myélome multiple (MM), une tumeur de cellules B différenciées, les plasmocytes. Ce travail nous a conduits à proposer une approche thérapeutique, basée sur l'inhibition de la phosphorylation des protéines MAF. Cette étude fait l'objet d'une publication dans Blood Cancer Journal (Herath et al. 2014) et sera présentée dans la première partie de ce manuscrit.

Des études transcriptomiques ont mis en évidence la surexpression aberrante de *NRL*, un membre de la famille des facteurs de transcription MAF, dans le médulloblastome, une tumeur pédiatrique du cervelet. *NRL* n'est pas exprimé dans le cervelet sain. Bien que les autres membres de la famille MAF soient des oncogènes établis, il n'existe encore aucune donnée sur un rôle oncogénique potentiel de *NRL*.

Mon projet principal a permis de répondre aux questions suivantes :

- le facteur de transcription *NRL* est-il un oncogène?
- est-il nécessaire à la tumorigénèse?
- quels sont le(s) gène(s) régulé(s) par *NRL* dans ce cadre?
- les gènes cibles mis en jeu constituent-ils des cibles thérapeutiques envisageables ?

Ce travail sera soumis prochainement pour publication et sera présenté dans la seconde partie de ce manuscrit.

L'ensemble de cette étude porte sur les facteurs de transcription MAF dans l'oncogenèse, qu'il s'agisse de leur régulation post-traductionnelle ou bien des mécanismes impliqués dans la tumorigénèse. L'introduction de ce manuscrit est divisée en quatre parties. La première porte sur les protéines MAF, et notamment sur leur structure et leur dualité fonctionnelle. La seconde s'intéresse plus particulièrement à *NRL*, pour lequel une activité oncogénique n'avait pas encore été établie. Ici, nous apportons la première démonstration du rôle oncogénique de *NRL*, en particulier dans le médulloblastome (MB), une tumeur du cervelet. Enfin les facteurs de transcription MAF joueraient un rôle dans la protection contre l'apoptose des cellules tumorales, à travers la régulation de l'expression de *BCL-XL*, un membre de la famille des protéines anti-apoptotiques *BCL*. Ainsi, la quatrième partie a pour but de présenter, de

manière non exhaustive, l'apoptose ainsi que les stratégies thérapeutiques anti-tumorales associées aux protéines BCL.

Les outils expérimentaux développés pour la réalisation des projets exposés ci-dessus, m'ont conduit à participer à un projet incitatif et collaboratif de l'Institut Curie sur le rétinoblastome, une tumeur pédiatrique de la rétine. Celui-ci s'attache à identifier et valider fonctionnellement un gène indispensable à la survie des cellules tumorales dans des cas familiaux de rétinoblastome. Cette étude, pour laquelle j'apparais en tant que co-premier auteur, est soumise pour publication, et sera présentée en annexe de ce manuscrit.

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

1.1. Les membres de la famille MAF

La famille des facteurs de transcription MAF est constituée de sept membres qui se répartissent en deux sous-familles: celle des « grands membres » constituée par des protéines contenant un domaine de transactivation dans leur partie N-terminale et celle dont les membres en sont dépourvus, également appelés « petits membres » de la famille MAF (MAFF, MAFK, MAFG) (Figure 2). Les « grands membres » de la famille MAF regroupent les protéines c-MAF, MAFB, MAFA et NRL. Différents gènes orthologues aux gènes codant pour les grands membres MAF ont été isolés chez les vertébrés (mammifère, zebrafish, xénope, oiseaux) et chez les invertébrés (drosophile, nématode).

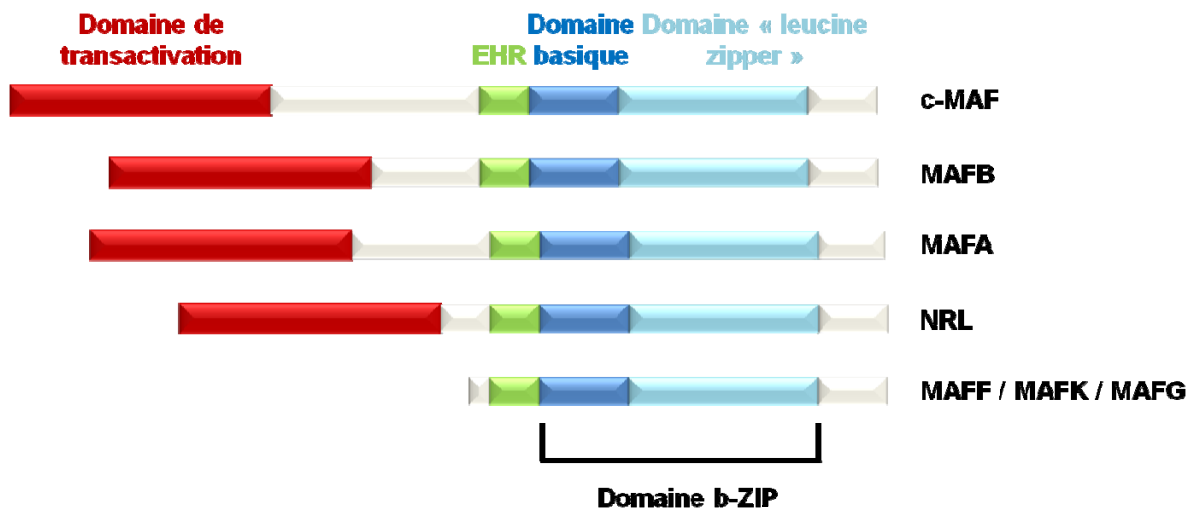


FIGURE 2 : STRUCTURE SCHEMATIQUE DES DIFFERENTS MEMBRES DE LA FAMILLE MAF

(Adaptée de Eychène, Rocques, et Pouponnot 2008)

1.2. Les domaines et leur fonction

Les protéines MAF sont toutes constituées d'un domaine b-ZIP (basic-region leucine zipper), commun à tous les membres de la famille AP-1 et d'une région d'homologie étendue (EHR) qui est spécifique à cette famille. Ces domaines sont nécessaires à la liaison des protéines MAF à l'ADN. Les grands membres de la famille contiennent un domaine de transactivation et un domaine riche en résidus glycine et histidine (Figure 2).

1.2.1. Domaine de liaison à l'ADN

Le domaine b-ZIP

Les protéines de la famille des facteurs de transcription AP-1, tels que JUN, FOS, ATF/CREB et les protéines de la famille MAF, possèdent un motif de type b-ZIP. Ce domaine nécessaire à la liaison à l'ADN se compose de deux sous-domaines fonctionnellement distincts : un domaine basique dans sa partie amino-terminale et une région de dimérisation appelée "Leucine Zipper" ou glissière à leucine dans sa partie carboxy-terminale. Notons que les protéines de la famille MAF ne peuvent se fixer à l'ADN que sous la forme de dimère.

Le domaine basique chargé positivement, permet aux protéines à domaine b-ZIP de se fixer directement sur la molécule d'ADN chargée négativement. Les régions basiques de liaison à l'ADN sont conservées entre les différentes protéines de la famille AP-1. Ce domaine est responsable de la reconnaissance spécifique de l'ADN. La formation d'un dimère permet de présenter les régions basiques dans une position adéquate pour leur interaction avec l'ADN. Chacune des régions basiques du domaine b-ZIP contacte un hémisite dans le grand sillon de l'ADN (Figure 3). Ainsi, les homodimères se fixent sur des séquences palindromiques spécifiques de l'ADN.

Le domaine « leucine zipper » est un domaine d'interaction protéine/protéine, nécessaire à la dimérisation des protéines de la famille AP-1. Il est caractérisé par la répétition de résidus leucines (tous les sept acides aminés) et adopte une structure en hélice α , de telle sorte que les leucines sont situées sur une même face de l'hélice, constituant ainsi une surface d'interaction hydrophobe. L'interaction de deux motifs « leucine zipper » induit une structure d'hélices entrelacées appelée « coiled-coil ». La spécificité de dimérisation serait conditionnée par ce motif et par un jeu d'interactions électrostatiques entre les résidus qui l'entourent (Pogenberg et al. 2014). Ceci pourrait expliquer que toutes les protéines AP-1 ne possèdent pas les mêmes propriétés de dimérisation, comme par exemple les protéines FOS capables de former uniquement des hétérodimères avec JUN et les MAF. Les protéines de la famille MAF sont capables quant à elles de former des homo- et des hétérodimères.

La Région d'Homologie Etendue (EHR)

Les protéines MAF sont similaires dans leur domaine de liaison à l'ADN. Ce sont des membres atypiques des facteurs de transcription de type b-ZIP puisqu'elles sont les seules à posséder une région d'homologie étendue (EHR), également appelée « Ancillary domain ». Cette région est capable de conférer aux protéines MAF une spécificité de liaison à l'ADN et une stabilité de liaison accrue. La structure du complexe MAFA-ADN a été résolue. Dans ce modèle, il est proposé que le domaine EHR ne se lie pas directement à l'ADN, mais stabilise la liaison du dimère MAF à l'ADN au niveau d'une séquence spécifique appelée MARE (MAF response element), par contact direct avec le domaine basique (Lu et al. 2012).

1.2.2. Domaine de transactivation

Les « grands membres » (c-MAF, MAFB, MAFA et NRL) se distinguent des « petits membres » (MAFF, MAFG et MAFK) par la présence dans leur région amino-terminale d'un domaine de transactivation riche en résidus acide glutamique, proline, sérine et thréonine (Figure 2). Le domaine de transactivation permet aux « grands membres » de la famille MAF d'interagir avec des co-facteurs tels que p300/CBP, PCAF, TBP et ainsi d'activer la transcription d'un ensemble de gènes particuliers. La délétion du domaine de transactivation des MAF abolit en grande partie leur capacité à activer la transcription. Cependant, ce domaine ne semble pas être le seul déterminant de la transactivation puisque ces protéines ainsi tronquées conservent une faible activité transcriptionnelle.

La partie centrale des protéines MAF contient des répétitions de résidus histidine pour MAFA et MAFB, alors que c-MAF présente des répétitions de résidus histidine et glycine. Ces répétitions ne sont pas retrouvées dans la séquence protéique ni de NRL, ni des « petits membres ». Leur rôle n'est pas connu, mais le pouvoir transactivateur différent pour chacun des membres de la famille MAF pourrait partiellement être dû à ces répétitions (Yoshida et Yasuda 2002). Cette étude montre que MAFB et c-MAF activent, de façon plus efficace que MAFA, un gène rapporteur contenant des séquences MARE. Cependant, MAFA induit l'expression de l' α -crystalline endogène contenant également une séquence MARE de façon plus efficace que les deux autres protéines.

1.3. Liaison à l'ADN des protéines MAF

1.3.1. Les sites de reconnaissance des protéines MAF (MARE)

Les protéines MAF se lient sous la forme de dimères (homo- ou hétérodimères) à des séquences d'ADN palindromiques appelées MARE (« MAF Responsive Element ») (Kataoka, Noda, et Nishizawa 1994; Kerppola et Curran 1994) (Figure 3). Le centre de ces palindromes, appelé « core », contient des sites consensus de fixation pour les protéines AP-1 ou CREB. Ce « core » peut être de type TRE (TPA-responsive element) ou CRE (cAMP-responsive element) et lie les protéines de la famille JUN/FOS ou de la famille ATF/CREB, respectivement. Sur cette base, les séquences reconnues par les protéines MAF sont dites de type T-MARE (ou TRE, TGCTGACTCAGCA) et C-MARE (ou CRE, TGCTGACGTCAGCA). Les nucléotides situés aux extrémités 5' et 3' des séquences MARE (TGC et GCA) sont déterminants pour la fixation des protéines MAF. En effet, les mutations dans la partie centrale du palindrome affecteraient peu la liaison des protéines MAF.

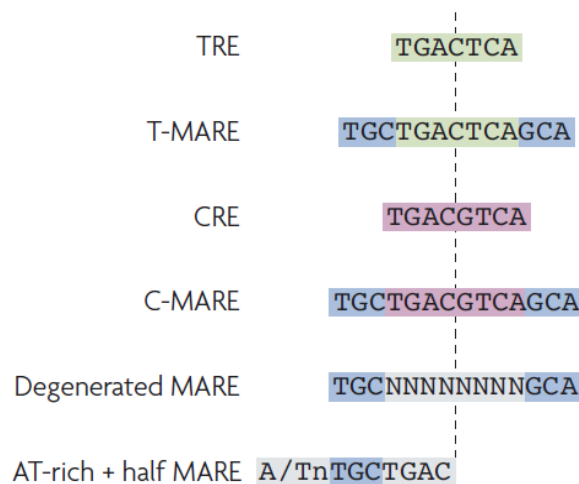


FIGURE 3 : LIAISON DES FACTEURS DE TRANSCRIPTION MAF A L'ADN

(Eychène, Rocques, et Pouponnot 2008) Le site consensus MARE (MAF Responsive Element) de fixation des protéines MAF peut être de type TRE (TPA-Responsive Element) en bleu, ou CRE (cAMP-Responsive Element) en rose. Le centre de ces palindromes, appelé « core », contient des sites consensus de fixation pour les protéines JUN/FOS (TRE) ou ATF/CREB (CRE). Les bases flanquantes du site MARE, en vert, sont déterminantes pour la fixation des protéines MAF. Les protéines MAF peuvent également se lier à une séquence MARE dégénérée (MARE minimal)

Les protéines MAF se fixent principalement sur les palindromes présentés ci-dessus sous forme d'homodimères (K Kataoka, Noda, et Nishizawa 1994; Kerppola et Curran 1994). *In vivo*, il a été montré que ces homodimères peuvent également se fixer sur des hémisites MARE lorsque ceux-ci sont précédés par une séquence riche en A/T (Yoshida et al. 2005).

1.3.2. Dimérisation des protéines MAF

Un des mécanismes les plus importants dans le contrôle de la régulation de la transcription par les facteurs à domaine b-ZIP est leur dimérisation par le domaine « leucine Zipper ». Les grandes protéines MAF sont capables de former des homodimères et des hétérodimères entre-elles, mais elles sont également capables de s'associer à d'autres protéines à domaine b-ZIP pour se fixer sur l'ADN (Figure 4). Des données biochimiques de dimérisation ont permis de mettre en évidence que les protéines MAF pourraient préférentiellement former des hétérodimères, du fait de résidus non favorables ou de charges répulsives autour des leucines, au niveau de la zone d'interaction (Vinson et al. 2002). Ces prédictions n'ont néanmoins pas été démontrées physiologiquement.

La dimérisation des « grands membres » de la famille MAF

Les « grands membres » de la famille MAF peuvent s'homo- ou hétérodimériser entre eux ainsi qu'avec un certain nombre d'autres facteurs de transcription. Cependant, les différents membres de la famille MAF ne présentent pas les mêmes capacités de dimérisation. En ce qui concerne la dimérisation des protéines MAF avec les autres protéines AP-1, il a été montré que c-MAF, NRL et MAFA sont capables de dimériser à la fois avec JUN et FOS alors que MAFB n'interagit qu'avec FOS. Ces hétérodimères n'ont pas été montrés *in vivo* et il est considéré que les grandes protéines MAF agissent essentiellement sous forme d'homodimères (Kohsuke Kataoka 2007). Seule la dimérisation de MAFB avec JUN, non identifiée *in vitro*, a été démontrée *in vivo* (Mechta-Grigoriou et al. 2003).

Sous forme d'homodimères, les MAF reconnaissent des séquences MARE. Dans le cas d'hétérodimères avec d'autres protéines à domaine b-ZIP, leur spécificité de liaison à l'ADN serait définie en fonction de chaque couple et n'impliquerait que des hémisites MARE. Une étude récente s'est intéressée à la dimérisation de MAFB et FOS. Les auteurs montrent que l'homodimère MAFB et l'hétérodimère MAFB/FOS reconnaissent des séquences d'ADN différentes. Cette différence de liaison s'expliquerait par la structure de type « coiled-coil » spécifique pour chaque type de dimérisation (Pogenberg et al. 2014).

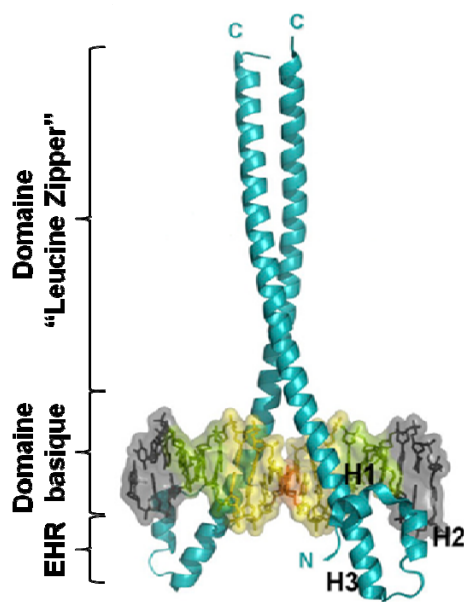


FIGURE 4 : STRUCTURE D'UN DIMERE DE FACTEURS DE TRANSCRIPTION MAF LIE A L'ADN

(Adaptée de Pogenberg et al. 2014) Le « domaine leucine-zipper » est un domaine d'interaction protéine/protéine, qui adopte une structure en hélice α , appelée « coiled-coil ». Le domaine basique se lie directement l'ADN sur le site MARE ou hémisite MARE en cas d'hétérodimérisation. Le domaine EHR (Région homologie étendue) permet de stabiliser la liaison du complexe à l'ADN

Les homo- et hétérodimères formés par les petites protéines MAF et les protéines Cap'n'Collar (CNC) peuvent se fixer à des sites MARE, qui ne sont pas strictement des palindromes. Ainsi il existe une grande variabilité dans ces séquences qui permet une fixation plus ou moins spécifique pour chaque hétérodimère (Yamamoto et al. 2006). Ces résultats suggèrent une grande diversité dans la régulation de l'expression des gènes cibles des facteurs de transcription MAF.

La dimérisation des « petits membres » de la famille MAF

Les petites protéines MAFF, MAFK et MAFG sont dépourvues de domaine de transactivation. Elles sont capables de s'homodimériser et d'agir ainsi comme des répresseurs transcriptionnels. Elles peuvent également former des hétérodimères avec d'autres facteurs de transcription de type b-ZIP, à l'exception des « grands membres » de la famille MAF. Ce sont des partenaires physiologiques très importants, puisque la dimérisation des petits membres de la famille MAF avec ses différents partenaires permet la reconnaissance de sites différents. Par des dimérisations différentielles, les « petits membres » MAF régulent la transcription de

façon positive ou négative des gènes cibles de leurs partenaires. Les premiers partenaires identifiés de ces « petits membres » de la famille sont des facteurs de transcription Cap'n'Collar (CNC), dont les prototypes sont les protéines p45-NF-E2 (Nuclear Factor Erythroid derived 2), NFE2L1 (Nuclear Factor Erythroid derived 2-like1), NRF1-2-3 (Kannan, Solovieva, et Blank 2012). Les petits membres sont capables d'interagir avec FOS mais pas avec JUN. Le dimère formé avec FOS pourrait entrer en compétition avec le complexe NF-E2 pour inhiber la transcription de leurs gènes cibles. Il a notamment été proposé que selon le complexe formé, MAF/p45-NF-E2 ou MAF/BACH1/2, l'expression des gènes contenant un site ARE peut être activée ou inhibée, respectivement (Igarashi et Sun 2006; J. Sun et al. 2004).

1.4. Dualité du rôle des protéines Maf : différenciateur/oncogène

Les facteurs de transcription MAF sont impliqués dans le développement, la différenciation terminale de type cellulaire spécifique et l'oncogenèse (Eychène, Rocques, et Pouponnot 2008; Kohsuke Kataoka 2007; Y. Yang et Cvekl 2007).

1.4.1. Rôle des protéines MAF dans les processus de différenciation

Au cours du développement, les MAF participent à des processus de mise en place et de maintien de l'état différencié de cellules. L'utilisation de modèles murins a permis de déterminer leur profil d'expression et de préciser le rôle de plusieurs membres de cette famille au cours du développement. Ces profils d'expression des membres de la famille MAF peuvent se chevaucher au cours du développement et chez l'adulte. Il a été suggéré une régulation de l'expression des facteurs de transcription MAF par eux-mêmes, puisque des séquences MARE sont retrouvées dans leurs promoteurs (K. Huang et al. 2000; Raum et al. 2006; Sakai et al. 2001). Les gènes *MAF* sont le plus souvent exprimés dans des cellules très spécialisées, où ils contrôlent l'expression de gènes impliqués dans la fonction particulière de ces cellules. Je présenterai uniquement la fonction des grands membres de la famille MAF (Tableau 1). Cette partie est basée sur l'étude des phénotypes observés chez les souris déficientes pour ces gènes MAF. Le rôle physiologique de NRL au cours du développement sera développé plus largement dans une partie propre.

MAF	Organe / Tissu / Type cellulaire	Réponse biologique	Gènes cibles
MAFA	Cristallin	Différenciation du cristallin	Cristallines
	Pancréas/cellules β	Expression de l'Insuline et production dans les cellules β adulte	Insuline
MAFB	Système nerveux	Détermination des rhombomères 5 et 6	Hoxa3 Hoxb3
		Fonction des neurones du complexe préBötC	
	Progéniteurs myéloïdes	Différenciation des macrophages	
	Podocytes rénaux	Différenciation des podocytes	Podocine Nephrine
	Pancréas	Détermination et maturation des cellules bêta embryonnaires	Glucagon Insuline
c-MAF	Cellules T	Détermination des cellules TH2	IL4
	Neurones sensoriels cutanés	Détermination et maturation des mécanorécepteurs à adaptation lente et rapide	
	Cristallin	Différenciation du cristallin	Cristallines
	Macrophage	Fonction des macrophages	IL10
	Os cartilagineux	Différenciation des chondrocytes	Collagène de type II $\alpha 1$
NRL	Rétine	Détermination et différenciation des photorécepteurs de type bâtonnet	RHO NR2E3 GNAT1 PDE6B

TABLEAU 1 : TABLEAU RECAPITULATIF DU ROLE PHYSIOLOGIQUE DES GRANDS MEMBRES DE LA FAMILLE MAF.

(Adapté de Eychène, Rocques, et Pouponnot 2008)

c-MAF

La protéine c-MAF participe au contrôle de la différenciation des lymphocytes auxiliaires de type 2 (aussi appelés cellules T helper 2-TH2), en régulant entre autre l'expression d'une cytokine spécifique, l'interleukine-4 (IL-4). Les cellules TH2 sont des cellules non cytotoxiques, Dans les cellules TH2, c-MAF et NFAT coopéreraient pour activer l'expression d'IL-4 (Ho et al. 1996). Dans les cellules T, c-MAF semble promouvoir la différenciation des cellules TH2, au détriment de la différenciation des cellules T helper 1 (TH1), probablement en empêchant l'expression de l'interleukine 12, spécifique des cellules TH1 (Ho, Lo, et Glimcher 1998). Ceci est en accord avec une observation faite dans les macrophages où il a été montré que c-MAF peut réprimer l'expression d'une sous-unité de l'interleukine 12 après leur activation (Homma et al. 2007). Dans ce même type cellulaire, c-MAF induit l'expression d'une autre cytokine, l'interleukine 10 (IL-10) mais cette régulation ne semble

pas avoir lieu dans les cellules TH2. En effet, les cellules T issues des souris déficientes pour le gène *c-maf* montrent une diminution de la production d'IL-4 sans affecter la production d'IL-10 (J. I. Kim, Ho, et al. 1999). Au contraire, les macrophages issus de ces mêmes souris présentent un défaut de production d'IL-10 en réponse à un pathogène (Cao et al. 2005). c-MAF jouerait un double rôle dans la réponse immunitaire, d'une part dans la fonction des macrophages et d'autre part dans la différenciation de cellules TH2. Dans ces deux systèmes, c-MAF pourrait contrôler des gènes cibles différents.

De plus, c-MAF joue un rôle essentiel dans la formation du cristallin en régulant l'expression des gènes des cristallines, en coopération avec par exemple Pax6, CREB, Sox1 et 2 (J. I. Kim, Li, et al. 1999). Le phénotype principal des souris invalidées pour le gène *c-MAF* est une microphthalmie caractérisée par une structure cristallinienne anormale due à une mauvaise différenciation des cellules du cristallin (S. Kawauchi et al. 1999; J. I. Kim, Li, et al. 1999).

Récemment l'expression de c-MAF a été identifiée dans deux types de neurones sensoriels cutanés, des mécanorécepteurs à adaptation lente et rapide. La protéine c-MAF est nécessaire à leur différenciation et à leur fonction. En effet, les souris déficientes pour *c-MAF* montrent une réduction de la stimulation mécanique ainsi qu'une diminution de la vitesse de conduction de l'influx nerveux. La protéine c-MAF est requise pour l'intégration des signaux mécaniques induits par le toucher (Wende et al. 2012).

Qu'il soit exprimé dans certaines cellules du système nerveux ou du compartiment lymphocytaire, le facteur de transcription c-MAF est essentiel pour la différenciation terminale et la fonction de ces cellules.

MAFB

Le gène *MAFB* est exprimé dans le système nerveux et dans d'autres tissus ou organes comme l'intestin, le foie, la rate et la moelle osseuse (Eichmann et al. 1997). Dans le système hématopoïétique, MAFB est exprimé dans les macrophages et les monocytes (Sieweke et al. 1996). Sa surexpression favorise la différenciation des précurseurs myéloïdes en macrophages (L. M. Kelly et al. 2000). L'analyse des macrophages issus des souris dont le gène *mafB* a été invalidé, a montré que ceux-ci étaient présents et fonctionnels (Aziz et al. 2006), suggérant une redondance fonctionnelle dans la différenciation des macrophages. Cependant il a été montré que les souris déficientes pour *mafB*, présentent un défaut de macrophages alvéolaires (Sato-Nishiwaki et al. 2013) et la perte de *mafB* affecte la maturation d'un sous-type

particulier de macrophages (Moriguchi et al. 2006). La perte de MAFB induit une désorganisation du cytosquelette d'actine dans ces macrophages (Aziz et al. 2006; Sato-Nishiwaki et al. 2013). Les gènes c-MAF et MAFB sont les deux exprimés dans les macrophages, des cellules différenciées qui ne se divisent plus. De façon intéressante, tandis que les souris simples KO de *c-maf* ou *mafB* présentent des macrophages fonctionnels, l'extinction de l'expression de ces deux gènes restaure la capacité de ces macrophages à se diviser sans affecter leur état différencié (Aziz et al. 2009). Dans ces cellules, il existerait une redondance fonctionnelle entre c-MAF et MAFB.

Dans les reins, MAFB est essentiel à la différenciation et à la fonction des podocytes, des cellules épithéliales différenciées, capables de filtrer le plasma sanguin (Brunskill et al. 2011; Sadl et al. 2002). En effet, MAFB régule des gènes nécessaires à leur fonction, comme par exemple, la podocine et la nephrine.

Dans le pancréas, MAFB est requis pour la maturation des îlots de Langerhans au cours du développement, en partie en régulant l'expression de l'insuline et du glucagon (Artner et al. 2007). MAFB serait nécessaire à la maturation des cellules bêta du pancréas uniquement durant le développement embryonnaire. En effet *MAFB* n'est plus exprimé dans ces cellules chez l'adulte, au profit de MAFA (Artner et al. 2010).

Dans le système nerveux, MAFB joue un rôle au cours du développement dans la formation de certains rhombomères du rhombencéphale et est exprimé dans les neurones du complexe PréBötC, impliqué dans le contrôle de rythme respiratoire. L'analyse du phénotype des souris dont le gène *mafB* a été invalidé montre que les souris meurent à la naissance d'un arrêt respiratoire, probablement dû à un défaut des neurones du PréBötC (Blanchi et al. 2003).

MAFA

Le gène *MAFA* a été isolé au laboratoire dans la neurorétine de caille (Benkhelifa et al. 1998). Parallèlement, il a été isolé dans le cristallin chez le poulet où la protéine MAFA est capable d'induire l'expression des cristallines (Ogino et Yasuda 1998). *MAFA* est également exprimé dans le cerveau, les reins, le pancréas, les muscles, le tube neural et le système nerveux périphérique chez l'embryon de poulet (Lecoin et al. 2004). Les souris déficientes pour le gène *mafA* sont intolérantes au glucose et développent un diabète de type 2 (C. Zhang et al. 2005). Le facteur de transcription MAFA joue un rôle essentiel dans la fonction des cellules bêta du pancréas adulte, en régulant notamment l'expression de l'insuline en réponse au

glucose (Aguayo-Mazzucato et al. 2011; Artner et al. 2010; Hang et al. 2014; Olbrot et al. 2002). Une diminution de l'expression de *MAFA* a été retrouvée dans des cas de diabète de type 2 chez l'Homme (Butler et al. 2012).

Les facteurs de transcription MAF présentent une forte homologie et pourraient être redondants d'un point de vue fonctionnel. Les différentes protéines MAF exerceraient également des fonctions spécifiques. De plus, l'expression des MAF est restreinte à des tissus particuliers au cours du développement et chez l'adulte. Il doit exister une régulation spatio-temporelle de l'expression et de l'activité des facteurs de transcription MAF, faisant intervenir des partenaires spécifiques d'un tissu et/ou d'une fonction donnée, et des modifications post-traductionnelles. Tous les grands membres de la famille MAF jouent un rôle dans la différenciation terminale de cellules spécifiques dans un tissu donné, ne laissant pas présager d'un rôle dans l'oncogénèse.

1.4.2. Les protéines MAF dans l'oncogénèse

L'oncogène *v-maf*, homologue viral de *c-MAF*, capable d'induire des fibrosarcomes chez le poulet constitue la première illustration de l'implication des facteurs de transcription MAF dans l'oncogénèse (M Nishizawa et al. 1989). En sus de leurs rôles dans le développement, plusieurs « grands membres » de la famille MAF (*MAFA*, *MAFB* et *c-MAF*) ont été clairement démontrés comme étant des oncogènes suite à leur surexpression que ce soit *in vitro*, *in vivo* et dans des cancers chez l'Homme (Eychène, Rocques, et Pouponnot 2008). Aucune donnée de ce genre n'a pour le moment été rapportée concernant NRL.

In vitro

Au contraire des petits membres (Fujiwara, Kataoka, et Nishizawa 1993), la surexpression des protéines *MAFA*, *c-MAF* ou *MAFB* conduit à la transformation de cultures primaires de fibroblastes embryonnaires de poulet et leurs confère la capacité de croître en absence d'ancrage (Kataoka, Nishizawa, et Kawai 1993; K Kataoka et al. 2001; Makoto Nishizawa, Kataoka, et Vogt 2003; Pouponnot et al. 2006). Des études comparant les propriétés transactivatrices et oncogéniques des protéines MAF ont montré que *MAFA* est plus transformant que *c-MAF*, lui-même l'étant plus que *MAFB*, alors que le pouvoir transactivateur de *MAFA* serait plus faible (Makoto Nishizawa, Kataoka, et Vogt 2003; Pouponnot et al. 2006). Ces différences seraient liées au domaine basique propre à chacun des

MAF et nécessaire à la reconnaissance des sites MARE (Makoto Nishizawa, Kataoka, et Vogt 2003; Pogenberg et al. 2014).

In vivo

In vivo, le rôle oncogénique des MAF a été établi dans le compartiment hématopoïétique. En effet des souris transgéniques où *c-MAF* est surexprimé dans le compartiment des cellules T développent des lymphomes T (Morito et al. 2006). Des souris transgéniques où *c-MAF* est surexprimé dans le compartiment des cellules B développent des lymphomes B. Ces tumeurs présentent des caractéristiques communes (expansion des plasmocytes et hyperglobulinémie) avec le myélome multiple (Morito et al. 2011).

Chez l'Homme

Chez l'Homme, les gènes *c-MAF*, *MAFB* et *MAFA* sont surexprimés dans 60% des lymphomes T angioimmunoblastiques (Chng et al. 2007; Morito et al. 2006; Murakami et al. 2007). Le gène *c-MAF* est surexprimé dans 50% des cas de myélomes multiples (MM), où la protéine *c-MAF* a directement été impliquée dans la progression tumorale (Hurt et al. 2004). Dans 5 à 10% des cas, cette surexpression résulte d'une translocation chromosomique au niveau du locus des chaînes lourdes des immunoglobulines (P L Bergsagel et Kuehl 2001). D'autres translocations impliquent les gènes *MAFA* (Chng et al. 2007) et *MAFB* (Boersma-Vreugdenhil et al. 2004; Hanamura et al. 2001).

Les protéines MAF ont un rôle causatif dans ces tumeurs (Figure 5). En effet, elles jouent un rôle actif au cours de la progression tumorale, en contrôlant le cycle cellulaire par l'intermédiaire de l'induction du gène de la *CYCLINE-D2* (*CCND2*). Les protéines MAF permettent une meilleure interaction entre les cellules cancéreuses et les cellules stromales de la moelle, en induisant l'expression d'un gène d'adhésion, l'*INTEGRINE-β7* (*ITGB7*), et elles favorisent l'invasion en induisant l'expression d'*ARK5* (A. Suzuki et al. 2005).

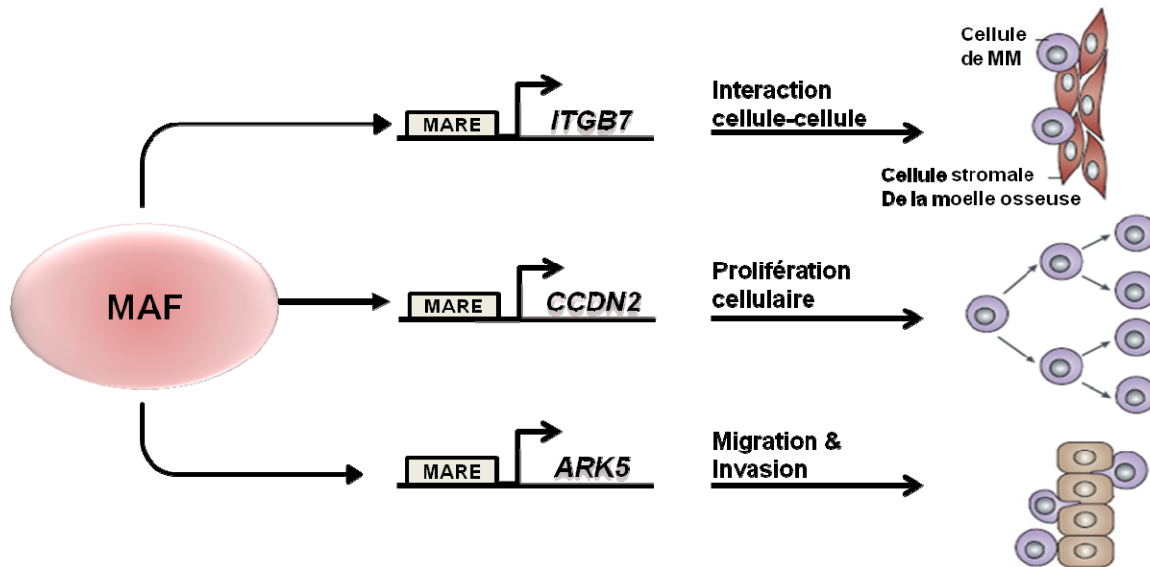


FIGURE 5 : MODELE DU ROLE DES PROTEINES MAF DANS LES CANCERS

(Adaptée de Eychène, Rocques, et Pouponnot 2008) Les grands membres de la famille MAF sont impliqués dans la progression du myélome multiple, à travers la dérégulation de différents gènes cibles. Ils participent à la prolifération cellulaire par l'induction de CCND2, à la migration et l'invasion par la régulation d'ARK5, aux interactions cellule-cellule par l'induction de l'ITGB7. Une séquence MARE est présente dans le promoteur de tous ces gènes.

Dans l'oncogénèse, les protéines MAF ont un rôle paradoxal, agissant comme oncogène ou comme suppresseur de tumeur. Par exemple, l'expression de *c-MAF* est réprimée dans des cancers de la prostate, suggérant un rôle potentiel de « suppresseur de tumeur » pour *c-MAF* (Watson et al. 2004). Dans les tumeurs malignes de la gaine des nerfs périphériques (MPNST), *c-MAF* est nécessaire à la croissance tumorale et à la survie par la régulation de l'expression de DEPTOR dans les MPNST exprimant *c-MAF* (Brundage et al. 2014). Tandis que sa réexpression dans des MPNST qui n'expriment pas *c-MAF* conduit à la mort de ces cellules, à une diminution de la croissance en absence d'ancrage et à une réduction de l'activité métabolique (Brundage et al. 2014).

Le pouvoir oncogénique des protéines MAF est hautement dépendant du contexte cellulaire, nutritif (Pouponnot et al. 2006) et de l'état de phosphorylation (Herath et al. 2014; Rocques et al. 2007) et de SUMOylation des protéines MAF (Kanai et al. 2010). Dans certaines conditions, le pouvoir différenciateur des MAF peut être dominant sur leur pouvoir transformant. Elles sont capables d'inhiber la transformation induite par d'autres oncogènes

tels que HRAS ou BRAF (Pouponnot et al. 2006). L'activité transformante des facteurs de transcription MAF est essentiellement liée à leur surexpression, à leur régulation post-traductionnelle et à la régulation de gènes cibles particuliers.

En fonction du contexte les facteurs de transcription de la famille MAF sont capables de jouer un double rôle grâce à la régulation de gènes cibles différents. Ils sont d'importants régulateurs de la différenciation cellulaire au cours du développement embryonnaire. Ce sont également des acteurs de l'oncogenèse, au travers de l'acquisition de nouvelles fonctions biologiques. Au contraire des autres grands membres de la famille MAF (c-MAF, MAFB et MAFA), aucune activité oncogénique de NRL n'a été établie dans la littérature. Les profils d'expression des différents gènes MAF, ainsi que leurs gènes cibles sont différents dans des contextes physiologiques ou cancéreux. Cela suggère que les facteurs de transcription MAF joueraient un rôle direct dans la carcinogenèse, indépendamment de la dérégulation de leur fonction physiologique.

1.5. Activité transcriptionnelle des protéines MAF

Les propriétés transcriptionnelles des facteurs de transcription de la famille MAF sont liées à une activité transactivatrice intrinsèque que seuls les « grands membres » de la famille MAF possèdent (K Kataoka, Noda, et Nishizawa 1996; Kumar et al. 1996). Ces propriétés transcriptionnelles des MAF peuvent être régulées par des modifications post-traductionnelles de ces protéines, en réalisant des interactions avec différents partenaires.

1.5.1. Régulation post-traductionnelle de l'activité transactivatrice des protéines MAF par modifications post-traductionnelles

Les protéines MAF sont régulées par différentes modifications post-traductionnelles (phosphorylation, sumoylation, acétylation). Ces modifications influencent leur activité, leur stabilité ou leurs interactions avec leurs partenaires.

La protéine MAFA est phosphorylée au niveau des résidus Ser14 et Ser65. Ces sites sont phosphorylables *in vitro* par la MAPK ERK2 même si la contribution de cette kinase *in vivo* est faible. Ces phosphorylations sont nécessaires à l'activité transcriptionnelle et biologique de MAFA (Benkhelifa et al. 2001). En effet, une protéine MAFA mutante non phosphorylable

(S14A/S65A) a une activité transcriptionnelle réduite au niveau du promoteur de ses gènes cibles, les cristallines. L'activité biologique de cette protéine est également affectée puisque, au contraire de la protéine sauvage, sa surexpression n'est pas suffisante pour induire une transdifférenciation de la neurorétine. MAFA est également phosphorylée par la MAPK p38, au niveau des résidus Thr57, Thr113 et Ser272. Ces phosphorylations serviraient également au contrôle de son activité biologique (Sii-Felice et al. 2005). La différenciation du cristallin est induite par le FGF (Fibroblast Growth Factor) produit par la neurorétine. Dans un premier temps, une stimulation par le FGF induit une prolifération des cellules et la répression des gènes spécifiques du cristallin. Au cours des premiers stades de cette différenciation, la réponse au FGF serait véhiculée par la voie MAP-Kinase pour induire la phosphorylation (Thr57 et Ser65) et la déstabilisation de la protéine MAFA. La transcription des cristallines, gènes cibles de MAFA en est diminuée (Ochi et al. 2003). Puis, par un mécanisme encore inconnu, MAFA serait à nouveau stabilisée dans ces cellules permettant ainsi la transcription des cristallines. L'inhibition de la voie MAP-kinase conduit à une diminution de l'activité transcriptionnelle. La phosphorylation de c-MAF sur trois résidus tyrosine 21, 92, 131 est indispensable au recrutement de c-MAF au niveau du promoteur du gène de l'interleukine 4 (Il-4) dans les cellules TH2 (Lai et al. 2012).

Au laboratoire il a été établi que la phosphorylation séquentielle de la protéine MAFA par GSK3 sur les résidus sérines/thréonines S61, T57, T53 et S49, favorise l'activité transformante de MAFA, tout en accélérant sa dégradation (Rocques et al. 2007). En effet, la phosphorylation de MAFA est nécessaire pour son activité transactivatrice, à travers notamment le recrutement du co-activateur P/CAF. Lorsque la forme phosphorylée de MAFA interagit avec P/CAF pour activer l'expression de gènes cibles, elle serait protégée de l'ubiquitination. Lors de la dissociation du complexe MAFA-P/CAF, la protéine MAFA est alors ubiquitinée et dégradée. La phosphorylation de MAFA par GSK3 est nécessaire à l'activité oncogénique de MAFA. Dans la partie « Résultats », je présenterai le travail effectué sur l'implication des phosphorylations de c-MAF et MAFB dans le myélome multiple (Herath et al. 2014).

La protéine c-MAF serait ubiquitinée et dégradée par le protéasome, en réponse aux glucocorticostéroïdes (Mao et al. 2007). En effet, le traitement de lignées de myélomes multiples surexprimant *c-MAF* avec des glucocorticostéroïdes induit une diminution de la quantité de protéine c-MAF par un mécanisme dépendant de son ubiquitination et du

protéasome. Le mécanisme par lequel les glucocorticostéroïdes induisent l'ubiquitination de c-MAF pourrait être une augmentation de l'expression de l'ubiquitine C. La phosphorylation de MAFA favorise son ubiquitination et *ipso facto* sa dégradation (Rocques et al. 2007). Bien que l'état de phosphorylation de c-MAF ne soit pas connu, le niveau protéique de c-MAF pourrait être également régulé par ce mécanisme.

La SUMOylation consiste dans l'ajout d'un groupement SUMO sur une lysine. On trouve plusieurs sites de SUMOylation potentiels sur les différentes protéines MAF. Ces sites de SUMOylation sont conservés chez les grands membres MAF. Il a été montré que la protéine MAFB est SUMOylée *in vitro* et *in vivo* sur les lysines 32 et 297. MAFB favorise la différenciation des précurseurs myéloïdes en macrophages, alors qu'un autre facteur de transcription, c-MYB, peut bloquer cette différenciation et maintenir la prolifération des précurseurs. La SUMOylation de MAFB est directement impliquée dans cette balance puisqu'elle inhibe en partie son activité transactivatrice, et bloque la différenciation des précurseurs myéloïdes en macrophages. Inversement l'absence de SUMOylation de MAFB augmente son activité transactivatrice, et induit la différenciation des macrophages, malgré la présence de c-MYB dans les cellules (Tillmanns et al. 2007). MAFA est également SUMOylée. En effet, en présence d'un faible taux de glucose ou en réponse à un stress oxydatif, MAFA est SUMOylée au niveau de la Lys32 (Shao et Cobb 2009). Cette SUMOylation n'a d'effet ni sur la localisation cellulaire de MAFA, ni sur son ubiquitination et sa dégradation par le protéasome. La SUMOylation de MAFA altère cependant son activité oncogénique au profit de l'expression de gènes spécifiques de son activité différenciatrice (Kanai et al. 2010). La protéine c-MAF est, quant à elle SUMOylée sur la lysine 33, équivalente de la lysine 32 SUMOylée de MAFA et MAFB. Cette SUMOylation n'altère ni sa localisation nucléaire, ni sa stabilité, mais a pour conséquence une diminution de l'activité transcriptionnelle de c-MAF, notamment de l'expression de l'interleukine 4 (IL-4) dans les cellules TH2 (Lin et al. 2010).

Ces modifications post-traductionnelles déterminent les interactions différentielles des protéines MAF avec leurs partenaires et jouent donc un rôle important dans leurs activités. Bien que les résidus affectés par ces modifications post-traductionnelles soient conservés au sein des « grands membres » de la famille MAF (Figure 6), elles ne sont pas toujours mises en évidence pour chacun d'entre-eux. De plus, il est possible que leurs régulations et leurs conséquences ne soient pas forcément les mêmes.

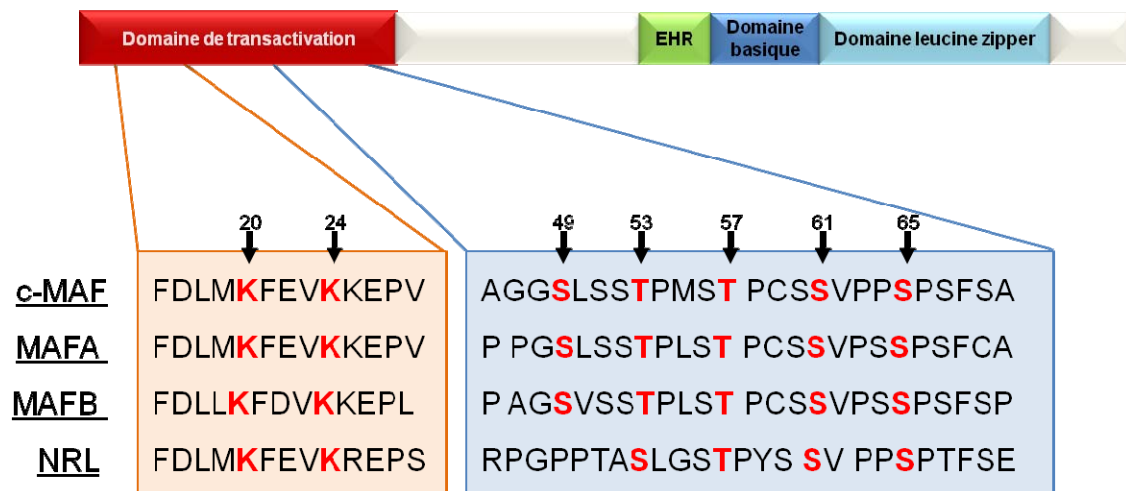


FIGURE 6 : REGULATION POST-TRADUCTIONNELLE DES GRANDS MEMBRES MAF SUR DES RESIDUS CONSERVES.

Les résidus ciblés par les modifications post-traductionnelles : SUMOylation (lysine, encadré orange) et phosphorylation (sérine/thréonine, encadré bleu) sont indiqués en rouge. Ces résidus se trouvent dans le domaine de transactivation.

1.5.2. Activité transactivatrice des protéines MAF et interaction avec leurs partenaires.

Les propriétés transactivatrices des facteurs de transcription MAF dépendent de leurs interactions avec leurs partenaires. Elles peuvent s'associer à d'autres facteurs de transcription et ainsi moduler la transcription des gènes cibles de ces derniers. La technique du double hybride a permis de mettre en évidence que la protéine NFAT (Nuclear Factor of Activated T-cells), qui régule l'expression de différentes cytokines, interagit avec c-MAF dans les lymphocytes T (Ho et al. 1996). c-MAF et NFAT agissent en synergie au niveau du promoteur de l'IL-4 pour contrôler son expression, dans des cellules spécifiques. Enfin, les MAF peuvent interagir avec des co-facteurs, nécessaires à la machinerie générale de transcription. Ceci pourrait permettre aux protéines MAF de réguler la transcription de leurs gènes cibles en fonction de l'expression de ces co-facteurs. Il a en effet été montré que c-MAF pouvait recruter CBP ou p300 au niveau des promoteurs des gènes des α A-, β 2-, et γ F-cristallines (Q. Chen et al. 2002). L'activité acétyl-transférase de CBP/p300 induirait l'acétylation des histones, le remaniement de la chromatine au niveau des promoteurs de ces gènes et donc une augmentation de leur expression. La protéine NRL est quant à elle capable de recruter directement la protéine TBP (« TATA Binding Protein ») ce qui permettrait la

formation du complexe d'initiation et l'activation de la transcription (Friedman et al. 2004). Au laboratoire il a été montré que MAFA interagit avec P/CAF, une histone acétyltransférase impliquée dans l'acétylation des histones, un état fortement associé à une transcription active (Rocques et al. 2007).

2. Neural Retina leucine zipper (NRL)

2.1. Expression de NRL

Identifié pour la première fois en 1992, le gène Neural Retina leucine zipper (NRL) est localisé sur le chromosome humain 14q11 (A Swaroop et al. 1992). Du fait de son homologie avec les autres « grands membres » MAF, NRL constitue l'un des facteurs de transcription de cette famille. *NRL* est retrouvé chez de nombreux vertébrés.

2.1.1. Profil d'expression de NRL

L'expression de NRL est restreinte à la rétine dans un sous-type particulier de photorécepteurs, les bâtonnets, impliqués dans la phototransduction du signal lumineux et plus particulièrement des faibles signaux lumineux et dans la vision noir et blanc. *NRL* est exprimé au cours de la maturation des précurseurs rétiniens en photorécepteur (E12 chez la souris). L'expression de NRL débute lors de la dernière division des précurseurs rétiniens post-mitotiques (CPM). Chez l'Homme, NRL n'est pas exprimé au cours du développement embryonnaire (Akimoto et al. 2006). NRL est également exprimé dans la glande pinéale (Swain et al. 2001), dont certains neurones présentent des caractéristiques communes avec les photorécepteurs de la rétine. A ce jour, aucune expression physiologique de NRL n'a été montrée dans d'autres types cellulaires de l'organisme.

2.1.2. Régulation de l'expression de NRL

L'expression de NRL serait régulée en deux temps au cours de la différenciation des photorécepteurs : une phase d'initiation et une phase de maintenance (Figure 7), et ce par trois facteurs de transcription : orthodenticle homeobox 2 (OTX2), cone-rod homeobox (CRX), RAR (retinoic acid receptor) -related orphan receptor β (ROR β). La liaison d'OTX2 et CRX au promoteur de NRL a été mise en évidence par des expériences d'immuno-précipitation de

chromatine (ChIP). La liaison de ROR β au promoteur de NRL a été montrée *in silico* (Montana et al. 2011). Durant la phase d'initiation, le facteur de transcription OTX2, en coopération avec ROR β , activerait la transcription de NRL. Ces deux facteurs de transcription sont tout deux exprimés dans les précurseurs post-mitotiques (CPM) des photorécepteurs. Dans ces précurseurs, OTX2 régule également l'expression de CRX. Au cours de la différenciation des photorécepteurs le niveau d'OTX2 diminue. Le facteur de transcription CRX remplace OTX2 durant la phase tardive de maintenance et coopère alors avec ROR β pour activer la transcription de NRL.

Il a été montré que l'expression de NRL pouvait être régulée dans la rétine par d'autres facteurs, tels que Myocyte-specific enhancer factor 2C (MEF2C), l'acide rétinoïque, des histones déacétylases (B. Chen et Cepko 2007).

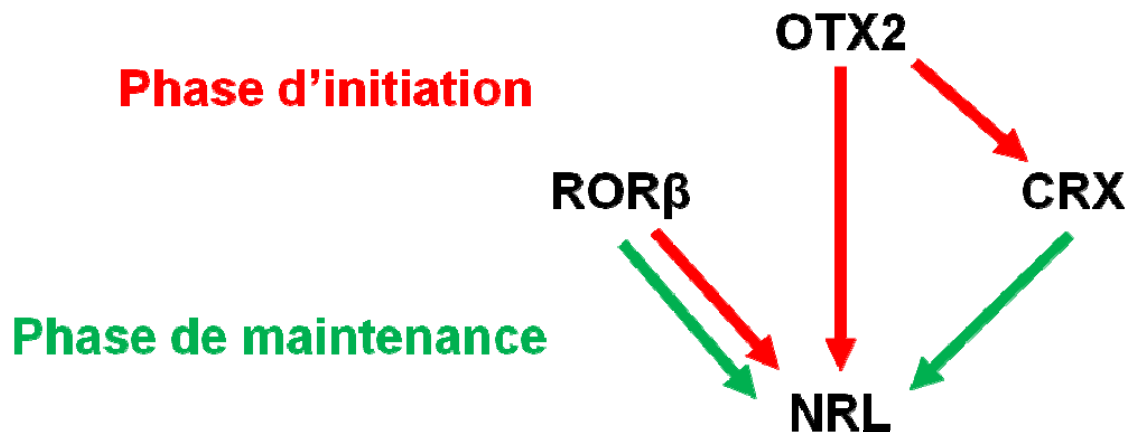


FIGURE 7 : MODELE DE LA REGULATION DE L'EXPRESSION DE NRL PAR LES FACTEURS DE TRANSCRIPTION OTX2, CRX ET ROR β

(Adaptée de Montana et al. 2011) L'expression de NRL est régulée en 2 phases. Durant la phase d'initiation (rouge), les facteurs de transcription OTX2 et ROR β jouent un rôle important dans l'expression de NRL et OTX2 régule l'expression de CRX. Durant la phase de maintenance (vert), ROR β et CRX deviennent des acteurs importants de la régulation de l'expression de NRL et l'expression d'OTX2 diminue.

2.2. Rôle physiologique

2.2.1. Rôle majeur dans la différenciation d'un sous-type de photorécepteurs

Le facteur de transcription NRL a une expression restreinte dans la rétine, où il joue un rôle clé dans la différenciation des bâtonnets. La souris déficiente pour NRL montre une absence

de photorécepteurs de type bâtonnets au profit de cônes de type S fonctionnels. Le nombre total de photorécepteurs n'est pas affecté (Mears et al. 2001). A l'inverse l'expression ectopique de NRL dans les précurseurs des photorécepteurs conduit à une absence de cône au profit des bâtonnets (Oh et al. 2007). Le facteur de transcription NRL régule positivement l'expression de gènes spécifiques des bâtonnets (Figure 8), tels que la rhodopsine, GNAT1, phosphodiesterase cGMP-spécifique, rod, beta (Pde6B), nuclear receptor subfamily 2, group E, member 3 (NR2E3), en se liant au promoteur de ces gènes sur une séquence MARE. NRL coopère avec le facteur de transcription CRX pour activer l'expression de nombreux gènes spécifiques des bâtonnets, comme par exemple la rhodopsine (Mitton et al. 2000; Pittler et al. 2004). Le complexe NRL-CRX agit également en coopération avec NR2E3 pour réguler l'expression d'autres gènes cibles, spécifiques des bâtonnets, tels que GNAT1 et PDE α (Cheng et al. 2006; Anand Swaroop, Kim, et Forrest 2010). En l'absence de CRX, le complexe NRL-NR2E3 inhibe l'expression de gènes spécifiques des cônes (S-opsin) (Mears et al. 2001).

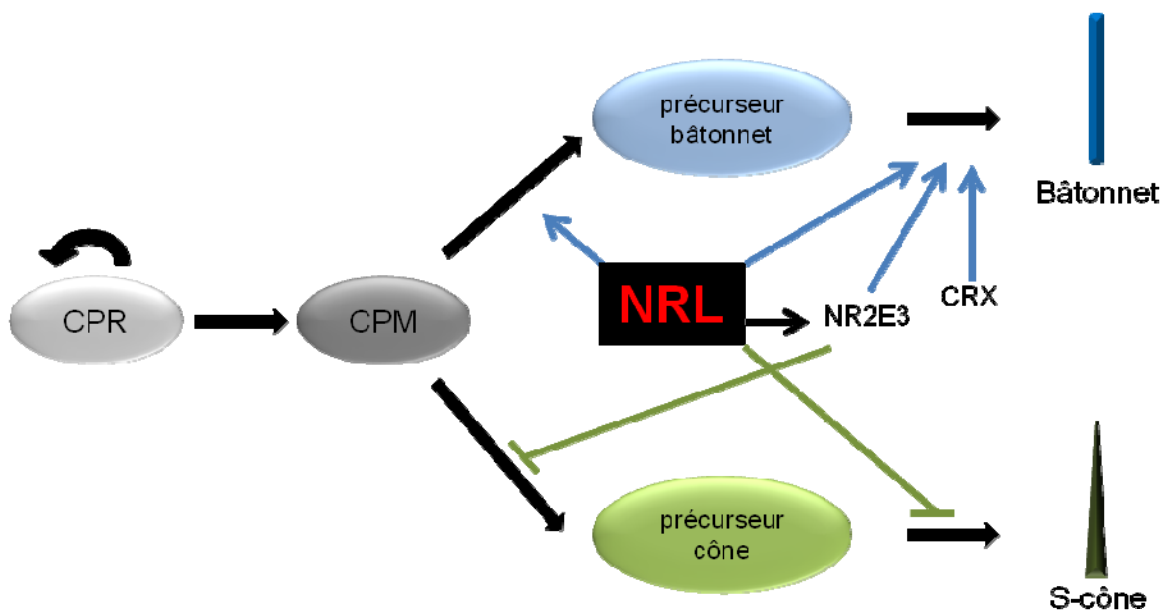


FIGURE 8 : RÔLE CENTRAL DU FACTEUR DE TRANSCRIPTION NRL DANS LA DIFFÉRENCIATION DES PHOTORECEPTEURS.

Les cellules pluripotentes de rétine (CPR) suite à une division asymétrique donnent naissance à une CPR et une cellule post-mitotique (CPM). Les CPM peuvent se différencier en précurseurs des 2 types de photorécepteurs : cône (vert) ou bâtonnet (bleu). NRL joue un rôle central dans la détermination des bâtonnets. Il régule l'expression de NR2E3, qui inhibe la différenciation des CPM en précurseur cône. NRL, en coopération avec NR2E3 et CRX favorise la différenciation des CPM en bâtonnets.

Plus récemment, l'interaction entre NRL et l'optineurine (OPTN) a été identifiée dans la rétine en condition de stress. En effet l'OPTN est localisée dans le cytoplasme tandis que NRL est localisée dans le noyau. Sous certaines conditions de stress, l'OPTN est transférée dans le noyau, où il peut interagir avec NRL. A ce jour, les gènes régulés par le complexe NRL-OPTN n'ont pas été identifiés, mais ce complexe pourrait être impliqué dans certaines pathologies, telles que le glaucome (C. Wang et al. 2014).

2.2.2. Régulation de l'activité de NRL

L'activité des grands membres de la famille MAF est régulée par des modifications post-traductionnelles (voir paragraphe 1.5.1.). Des travaux réalisés au laboratoire ont mis en évidence l'importance de la phosphorylation des « grands membres » par GSK3 pour leur rôle dans la transformation cellulaire et leur stabilité (Pouponnot et al. 2006; Rocques et al. 2007). Cela n'a pas été démontré pour NRL. Néanmoins, il existe six variants de phosphorylation de NRL impliqués dans des pathologies humaines, suggérant que la régulation par phosphorylation de l'activité de NRL serait importante pour exercer son rôle physiologique. La kinase MAPK2 (Mitogen Activated Protein Kinase 2) phosphoryle NRL sur de multiples résidus Sérine (Ser) et Thréonine (Thr) du domaine de transactivation (Swain et al. 2001). Plus récemment la phosphorylation de NRL sur la sérine 50 par la kinase JNK1 (c-Jun N-terminal kinase) a été mise en évidence. Elle permet le recrutement de l'histone acétyl-transférase Tip60 au promoteur des gènes cibles de NRL et favorise ainsi leur expression (J.-W. Kim et al. 2012). La phosphorylation par MAPK2 et/ou JNK1 augmente l'activité transcriptionnelle de NRL.

La SUMOylation des lysines 20 et 24 de NRL module également son activité transcriptionnelle au cours de la différenciation normale des bâtonnets. Seule la SUMOylation de la lysine 20 augmente la transcription de la rhodopsine, tandis que la double SUMOylation des lysines 20 et 24 favorise l'expression de NR2E3 (Roger et al. 2010).

Les modifications post-traductionnelles de NRL modulent son activité au cours du temps dans la différenciation des bâtonnets.

2.3. Mutations de NRL associées à des pathologies

Peu d'études portent sur l'importance des modifications post-traductionnelles sur la stabilité et l'activité de NRL. Néanmoins, de nombreuses mutations de sites de phosphorylation sont associées aux rétinopathies. Il est proposé que l'état de phosphorylation de NRL permet une régulation fine de son activité et de sa stabilité au cours du développement de la rétine, ainsi que de ses interactions avec ses partenaires. Des altérations de ces sites augmentent ou diminuent l'activité transcriptionnelle de NRL.

2.3.1. Mutation gain de fonction de NRL

Les principaux variants de phosphorylation de NRL sont impliqués dans la rétinite pigmentaire (retinitis pigmentosa, RP). Avec une incidence de 1 cas sur 4000, la RP est un ensemble de pathologies hétérogènes conduisant à une dégénérescence progressive de la rétine impliquant une perte de photorécepteurs (cônes et bâtonnets). Cette rétinopathie, associée à la perte de la vision nocturne et à une réduction du champ visuel se présente sous forme autosomale récessive (ARRP) ou dominante (ADRP).

Des mutations des résidus sérine 50 et proline 51 du domaine de transactivation sont impliquées dans ADRP. La perte de phosphorylation de la sérine 50 et la conversion d'un résidu non polaire en un résidu polaire conduit à une augmentation de l'activité transcriptionnelle de NRL, notamment en ce qui concerne l'expression de la Rhodopsine (*RHO*) (Hernan et al. 2012; Kanda et al. 2007).

2.3.2. Mutation perte de fonction de NRL

Les mutations perte de fonction de NRL conduisent à des rétinopathies, telles que le syndrome de dysfonction des cônes ou la dystrophie rétinienne pigmentaire. Par exemple, la mutation de la leucine 160 en proline, dans le domaine b-Zip, affecte la fixation de NRL au promoteur de ses gènes cibles (Kanda et al. 2007).

Aucune amplification ou mutation de NRL n'a à ce jour été identifiée dans d'autres pathologies et notamment dans des tumeurs. Bien qu'exprimé dans le rétinoblastome, aucune activité oncogénique de NRL n'y a été établie à ce jour.

3. Le médulloblastome

3.1. Généralités

Le médulloblastome (MB) est la plus fréquente des tumeurs primitives neuro-ectodermiques (PNET). Les PNET ont été définies en 1985 pour désigner des tumeurs embryonnaires, quasi spécifiques à l'enfant. D'autres sous-groupes minoritaires de PNET, appelés tumeurs rhabdoïde/ térétoïde atypiques (AT/RT), ont également pu être identifiés au sein du cervelet. Les AT/RT sont distinctes des MB, d'un point de vue clinique, morphologique et moléculaire (mutation non sens ou délétion du gène suppresseur de tumeur *SMARCB1* codant pour hSNF5) (Finkelstein-Shechter et al. 2010; M D Taylor et al. 2000). La majorité des MB surviennent avant l'âge de 10 ans (40% avant 5 ans et 75% avant 10 ans) mais il existe également des cas de MB chez l'adolescent et chez l'adulte. Les MB sont des tumeurs neuro-ectodermiques de la fosse postérieure, localisés dans le cervelet (Figure 9), le plus souvent au niveau du vermis chez l'enfant (70% des MB), et au niveau des hémisphères cérébelleux chez l'adulte (Bourdeaut, Pouponnot, et Ayrault 2012; Northcott, Korshunov, et al. 2011).

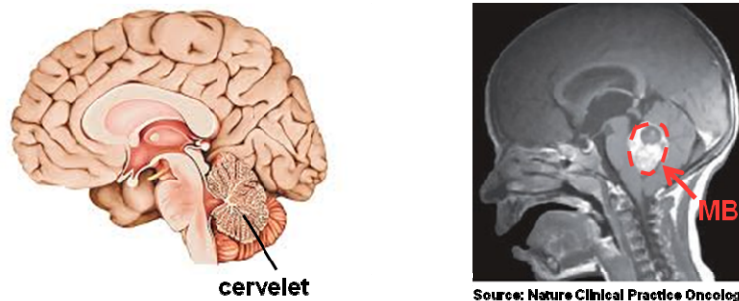


FIGURE 9 : LOCALISATION DU MB AU NIVEAU DU CERVELET

(Gauche) Schéma du cerveau humain. Le cervelet est situé à la base du crâne, en arrière du tronc cérébral. (Droite) IRM d'un enfant de 4 ans atteint d'un MB.

Afin de mieux comprendre les mécanismes qui conduisent au développement du MB, il est nécessaire de présenter le développement normal du cervelet. Celui-ci contient différents types cellulaires qui dérivent des progéniteurs suivants (Figure 10) :

- les progéniteurs des neurones glutamatergiques trouvent leur origine au niveau de la lèvre rhombique, puis migrent à travers la zone transitoire nucléaire et forment ainsi les noyaux profonds.

- les progéniteurs des cellules granulaires (GCP) prennent leur origine au niveau de la lèvre rhombique. Dans un premier temps ceux-ci migrent latéralement pour former la couche granulaire externe (EGL), où ils se divisent activement sous l'action de la molécule Sonic Hedgehog (SHH). Dans un second temps, les GCP migrent transversalement dans la couche granulaire interne (IGL) et se différencient en cellules granulaires.

- les précurseurs GABAergiques prennent leur origine dans la zone germinative primaire apposée au 4^{ème} ventricule et donnent naissance aux interneurons et aux cellules de Purkinje.

- une population de cellules présente dans la substance blanche du cervelet adulte uniquement et caractérisée par l'expression de marqueurs de cellule souche neurale, par exemple CD133, capables d'auto-renouvellement et pluripotentes (neurones, oligodendrocytes, astrocytes).

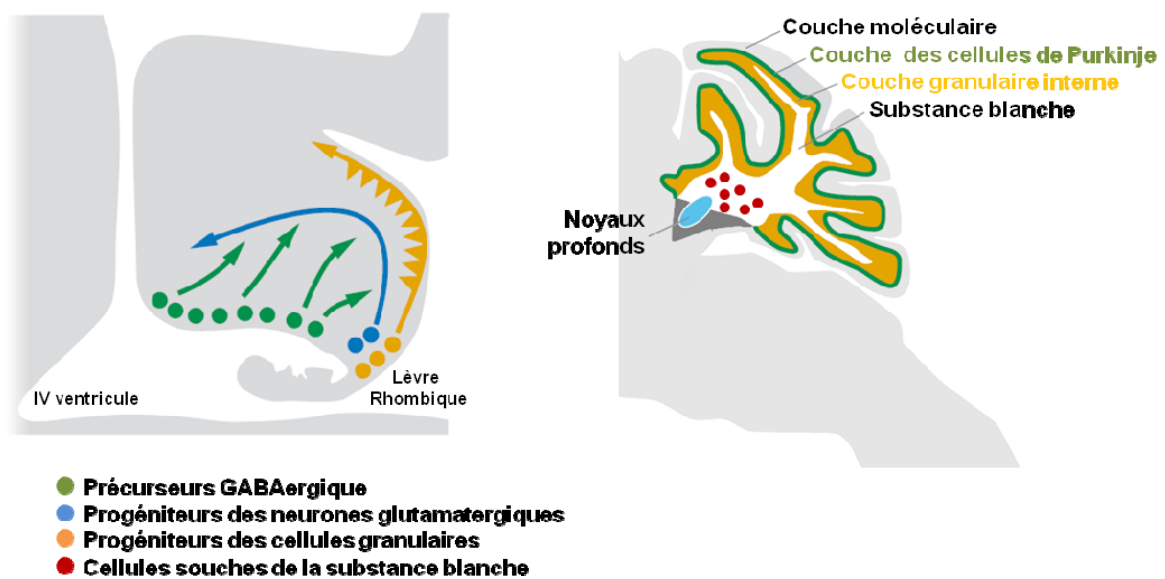


FIGURE 10 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE L'ORGANISATION DU CERVELET

(Adapté de Gilbertson et Ellison 2008) (Gauche) Les différents précurseurs des cellules du cervelet en développement. (Droite) Organisation du cervelet adulte. Les couleurs indiquent l'origine cellulaire.

Les processus de prolifération, de différenciation et de migration de ces différents précurseurs cellulaires du cervelet sont sous le contrôle d'un ensemble de signaux cellulaires. Une dérégulation de ces signaux pourrait conduire au développement des médulloblastomes

d'origine cellulaire distincte (Figure 11). L'implication de ces cellules comme étant potentiellement à l'origine de MB chez l'Homme sera discutée ultérieurement lors de la présentation des MB humains.

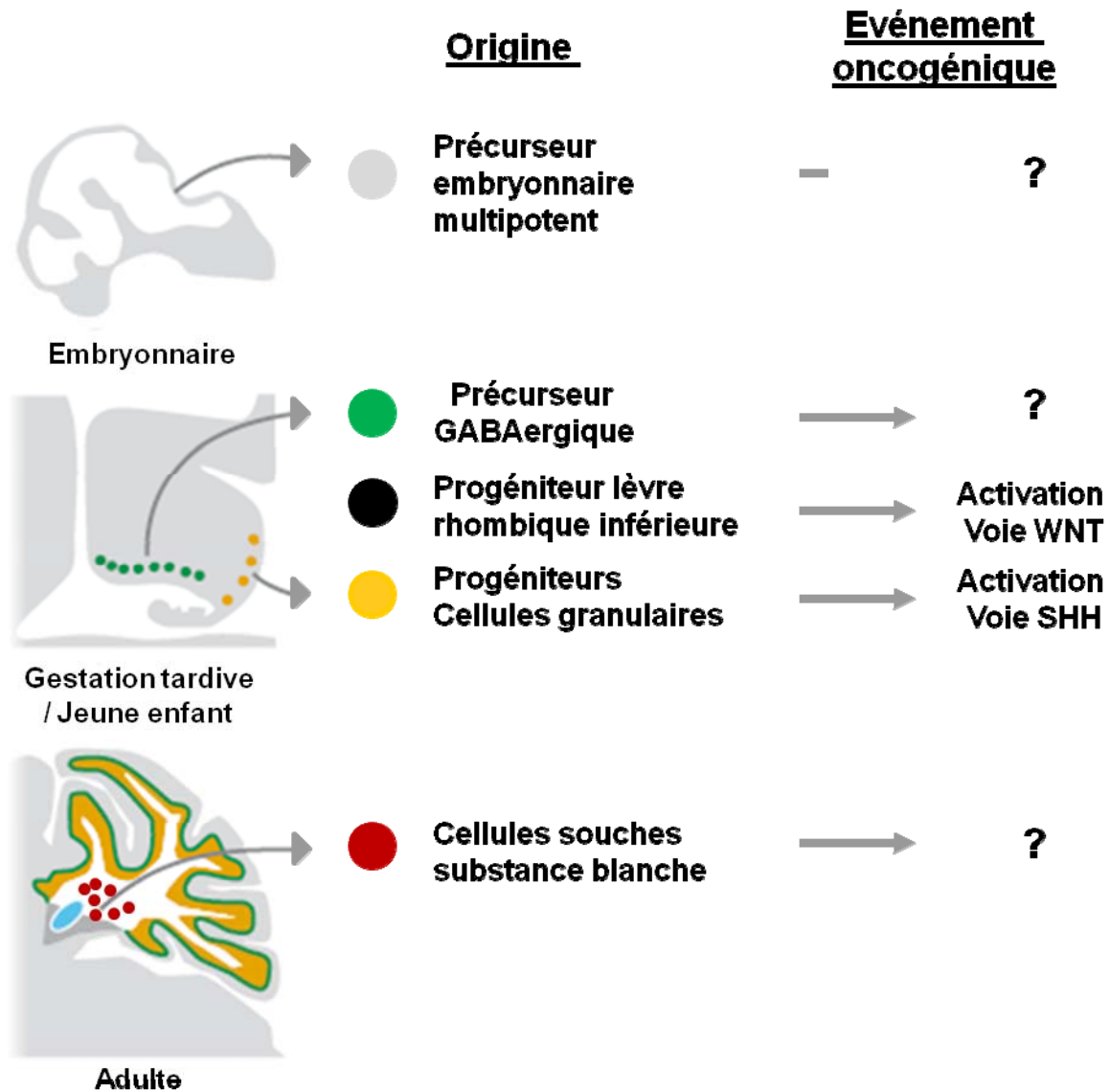


FIGURE 11 : ORIGINE DES SOUS-GROUPES DE MB

(Adapté de Gilbertson et Ellison 2008) Représentation des cellules d'origine potentielle (Origine) des différents types de MB et des voies de signalisation dérégulées (Evénement oncogénique).

Les signes cliniques du MB sont principalement une hypertension intra-crânienne pouvant être associée à un trouble de l'équilibre. En effet, le cervelet est un centre régulateur de la fonction motrice (mouvement, posture et équilibre). Des paralysies des nerfs crâniens peuvent

également survenir en cas d'infiltration du tronc cérébral. Néanmoins, les MB sont peu symptomatiques. De ce fait ils sont diagnostiqués tardivement et près de la moitié des enfants présentent des métastases au moment du diagnostic.

Les thérapies associant l'exérèse de la masse tumorale primaire à une chimiothérapie ou une radiothérapie à la fois locale et sur l'ensemble du système nerveux central, ont permis d'augmenter considérablement le taux de guérison des patients (Bartlett, Kortmann, et Saran 2013). Les effets secondaires liés au traitement restent malgré tout dramatiques à long terme. En effet les patients souffrent notamment de troubles de l'apprentissage, de la mémoire, de l'attention et de perte du langage. Environ 30% des patients restent insensibles aux traitements, d'où la nécessité de développer des thérapies plus ciblées.

3.2. Les sous-groupes de MB

Le nom générique de médulloblastome (MB) recouvre des entités tumorales distinctes aux points de vue histologique, anatomique, clinique et des voies de signalisation impliquées (Figure 12). Ils sont plus ou moins invasifs et peuvent former des métastases dans la totalité du système nerveux central, par la voie du liquide céphalo-rachidien et des méninges. Les MB peuvent être classés selon des caractéristiques histologiques. Cette classification comprend notamment les MB de types classiques, desmoplasiques/nodulaires et anaplasiques à larges cellules (LC/A) (Gilbertson et Ellison 2008). Le MB de type classique est formé de petites cellules avec un noyau rond entouré de peu de cytoplasme. Le MB desmoplasique est formé de nodules et de fibres de réticuline et de collagène. Enfin le MB de type LC/A est constitué de cellules avec un gros noyau rond, pleiomorphe et comprend des zones de nécrose. Ce dernier type histologique est associé à des MB de mauvais pronostic. Plus récemment une classification consensus, basée sur des analyses transcriptomiques a été établie. Elle détermine quatre sous-groupes de MB : Wingless (WNT), Hedgehog (HH), 3 et 4 (Northcott, Korshunov, et al. 2011; Northcott, Shih, et al. 2012; Michael D Taylor et al. 2012). Ces sous-groupes de MB sont associés à des caractéristiques moléculaires, génétiques, histologiques et cliniques particulières. Une analyse portant sur un ensemble de 673 médulloblastomes, a permis d'identifier un ensemble de bio-marqueurs, indicatifs de bon ou de mauvais pronostics au sein de chaque sous-groupe (Shih et al. 2014). Malgré cette hétérogénéité de MB, tous sont traités de manière identique. Ce panel de marques pronostiques est donc un outil essentiel dans la détermination du traitement à administrer. En appliquant un protocole de traitement

moins lourd et spécifique des différents sous-groupes aux patients atteints de MB de bon pronostic, les effets secondaires à long terme en seraient diminués.

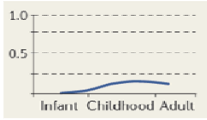
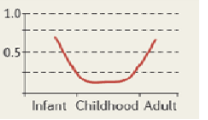
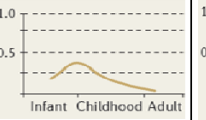
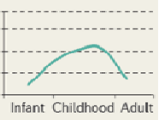
Sous-type		WNT	HH	3	4
Caractéristiques cliniques	Age				
	incidence	10%	30%	25%	35%
	Histologie	Classique; rarement LCA	Classique > desmoplasique/ nodulaire > LCA >	Classique >LCA	Classique; rarement LCA
	Métastase au diagnostique	5-10%	15-20%	40-45%	35-40%
	Survie globale (5ans)	95%	75%	50%	75%
	Cellule d'origine	Précurseur de la lèvre rhombique inférieure	Progéniteurs des cellules granulaires	Cellule d'origine inconnue	
Caractéristiques génomiques	Gène "driver"	CTNNB1	PTCH1	MYC	MYCN CDK6
	Signature	WNT	SHH	MYC & programme photorécepteur	Neuronal

FIGURE 12 : CLASSIFICATION DES MB
(Adaptée de Northcott, Shih, et al. 2012)

3.2.1. Le groupe WNT

Caractéristiques cliniques

Les MB du sous-groupe WNT représentent 10 à 15% des MB et sont généralement de bon pronostic. La survie à 5 ans atteint les 90%. Les rares cas de décès sont dus à des complications ou des tumeurs secondaires suite au traitement par radiothérapie. Une majorité de ces MB sont non-métastatiques. Les patients sont principalement des enfants ou des adolescents âgés de 4 à 15 ans. 10-15% des cas de MB adultes appartiennent à ce sous-groupe. D'un point de vue histologique, les MB de groupe WNT sont principalement de type

classique. Les MB WNT sont localisés à proximité de la face dorsale du tronc cérébral et au voisinage du 4^{ème} ventricule.

Altération génétique

Ces MB sont caractérisés par une activation constitutive de la voie WNT/ β -caténine. Celle-ci est impliquée dans de nombreux tissus, au cours du développement et notamment dans la prolifération et la maturation de progéniteurs neuronaux (Patapoutian et Reichardt 2000). L'un des principaux acteurs de cette voie est la protéine β -caténine, codée par le gène CTNNB1. En absence du ligand WNT, la voie est inactive. La β -caténine cytoplasmique est phosphorylée par GSK3 et est liée au complexe d'adressage au protéasome APC/Axine conduisant à sa dégradation. En présence du ligand WNT, la voie est activée. La protéine β -caténine cytoplasmique est libérée du complexe, puis transloquée dans le noyau où elle active la transcription de gènes cibles de la voie, par exemple c-MYC (He et al. 1998) et DKK1 (Niida et al. 2004) (Figure 13).

Plus de 75% de ces MB WNT présentent une mutation sur l'exon 3 du gène CTNNB1 (Schroeder et Gururangan 2014; Zurawel et al. 1998). Ces mutations touchent principalement les Sérines et Thréonines, cibles de la phosphorylation par la GSK3. La β -caténine non phosphorylée ne peut être dégradée par le protéasome. Ainsi la β -caténine mutée s'accumule constitutivement dans le noyau où elle pourra activer l'expression des gènes cibles de la voie WNT. Des mutations inactivatrices du gène APC (adenomatous polyposis coli) empêchent également la dégradation de la β -caténine par le protéasome et conduisent donc également à son accumulation nucléaire. Or les patients atteints du syndrome de Turcot, un syndrome de prédisposition aux cancers, sont porteurs d'une mutation germinale d'APC. Le syndrome de Turcot est un syndrome autosomal dominant rare, associé à une forte incidence des MB de groupe WNT. Des mutations somatiques du gène APC ont été décrites dans de rares cas de MB. (K. Huang et al. 2000). La détection de la β -caténine nucléaire par immunohistochimie, est utilisée en clinique afin d'identifier les MB de groupe WNT (Clifford et al. 2006; Ellison et al. 2011; Fattet et al. 2009).

La partie c-terminale de la β -caténine permet le recrutement d'une série de protéines impliquées dans le remodelage de la chromatine, pour ainsi promouvoir la transcription de gènes cibles de la voie WNT. Des mutations de certains de ces régulateurs épigénétiques sont retrouvées associées aux MB de groupe WNT présentant des mutations de CTNNB1 (Pugh et al. 2012; Robinson et al. 2012). Parmi les régulateurs, il est retrouvé une ATPase de la famille

SWI/SNF SMARCA4 (26%), l'histone méthyl-transférase MLL2 (12,5%). Il est suggéré que le développement des MB de ce sous-groupe suite à une mutation du gène CTNNB1 nécessiterait un remodelage de la chromatine des gènes cibles de la voie WNT.

Bien que le génome des tumeurs WNT soit relativement stable, une monosomie du chromosome 6 est retrouvée dans 79% des cas. Une minorité de MB de groupe WNT ne présente pas de mutation de CTNNB1, ou d'APC, suggérant ainsi l'implication d'autres mécanismes conduisant à une activation de la voie. D'autres mutations ont pu être identifiées dans des gènes tels que DDX3X (50%), TP53 (16%). Des mutations non sens dans le domaine hélicase de DDX3X induisent une mauvaise conformation de la protéine, et conduisent à une perte de fonction de DDX3X. Ces mutations de DDX3X favorisent l'activité transactivatrice de β -caténine, ayant pour conséquence une augmentation de la prolifération cellulaire. En effet chez la souris, l'expression de mutants perte de fonction de DDX3X dans les progéniteurs de la lèvre rhombique inférieure (LRLP) (se référer à la partie cellule d'origine des MB de groupe Wnt) favorisent leur prolifération sans affecter leur migration (Robinson et al. 2012).

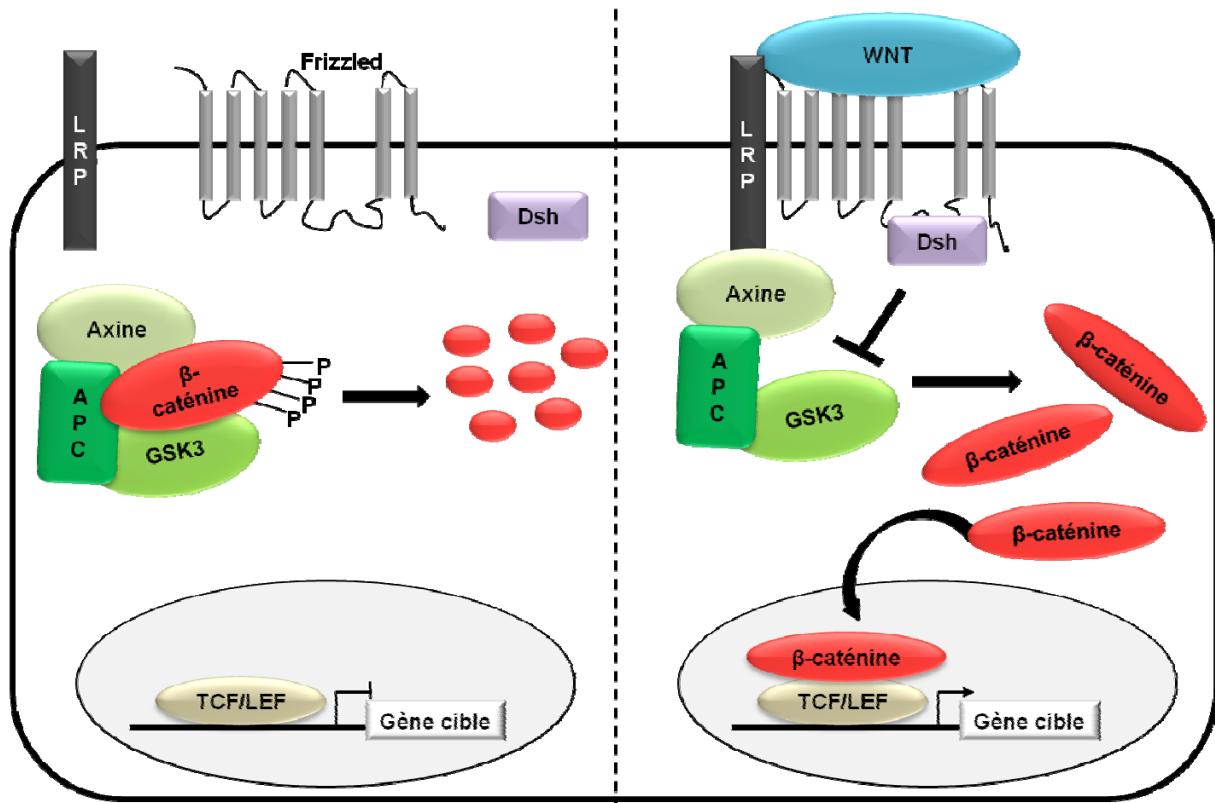


FIGURE 13 : SCHEMA SIMPLIFIE DE LA VOIE WNT

(Gauche) En l'absence du ligand Wnt (bleu), la β -caténine (rouge) est associée au complexe Axine /APC/GSK3 (vert). La kinase GSK3 phosphoryle la β -caténine, ce qui conduit à sa dégradation par le protéasome. Les gènes cibles de la voie WNT ne sont pas exprimés. (Droite) En présence du ligand Wnt, son récepteur Frizzled associé au co-récepteur LRP recrute la protéine cytoplasmique Dishevelled (Dsh, violet), et libère la β -caténine alors non-phosphorylée dans le cytoplasme. La β -caténine est transloquée dans le noyau où elle s'associe aux facteurs de transcription TCF/LEF pour activer la transcription des gènes cibles de la voie WNT.

Cellule d'origine des MB de groupe WNT

Au cours du développement du cervelet, le profil spatio-temporel de l'activation de la voie WNT a été établi (Selvadurai et Mason 2011). Chez la souris, la voie WNT serait active uniquement dans les stades précoces (E12,5-E18,5) dans les progéniteurs de la lèvre rhombique. Puis, une forte activation est observée dans la zone ventriculaire. Durant les premiers stades après la naissance, la voie WNT serait active dans la glie de Bergman. La voie WNT ne serait donc pas importante pour la migration et l'expansion des progéniteurs des neurones granulaires. La comparaison du profil d'expression génique de ces MB avec celui de progéniteurs neuronaux du cervelet, a permis de proposer un modèle, considérant les progéniteurs de la lèvre rhombique inférieure (LRLP) comme de potentielles cellules d'origine. Afin de valider cette hypothèse, les auteurs (Gibson et al. 2010) ont généré des

souris portant une forme constitutivement active de CTNNB1 (Ctnnb1 lox(ex3)) et le transgène Blbp-cre. Ce dernier induit efficacement la recombinaison dans les progéniteurs du tronc cérébral, comprenant la zone ventriculaire du cervelet, les progéniteurs des neurones granulaires et des progéniteurs de la LRL. Ces souris ne développent pas de tumeurs. Dans les MB WNT, les mutations de CTNNB1 sont fréquemment associées à la perte de TP53 (Pfaff et al. 2010). En accord avec cette observation, les animaux transgéniques CTNNB1 croisés avec des souris porteuses d'une délétion homozygote de TP53 développent des tumeurs du 4^{ème} ventricule anatomiquement et morphologiquement comparables aux MB de groupe WNT. Les profils d'expression génique de ces tumeurs se révèlent comparables à ceux des MB WNT humains (Gibson et al. 2010). Bien qu'il soit admis à présent que les LRLP sont les cellules d'origines des MB WNT, ce modèle demeure discutable. En effet l'expression de la Cre recombinase n'est pas restreinte à la LRL dans le modèle Blbp-cre. La protéine BLBP n'est pas un marqueur spécifique de ces cellules, puisqu'elle est également présente dans la glie de Bergman. Les souris issues du croisement de la souris Ctnnb1lox (ex3) avec une souris portant le transgène Atoh1-Cre, capable d'induire une recombinaison efficace dans les progéniteurs de neurones granulaires (GCP), ne développent pas de tumeurs, excluant de fait les GCP comme potentielles cellules d'origine. Bien qu'il soit admis aujourd'hui que les progéniteurs cérébelleux de la LRL (LRLP) sont les cellules d'origine des MB de groupe WNT, il n'existe aucune preuve définitive de cela. De plus l'activation de la voie WNT est nécessaire mais non suffisante pour la tumorigénèse.

3.2.2. Le groupe HH (Sonic Hedgehog)

Caractéristiques cliniques

Les MB du groupe HH, sont les mieux caractérisés et représentent 25% des MB. Ils se développent principalement chez les jeunes enfants (avant 3 ans) et les adultes (au-delà de 16 ans). 2/3 des MB adultes appartiennent à ce sous-groupe. Quelques cas de MB HH ont été observés chez des enfants âgés de 4 à 15 ans. Les MB HH sont caractérisés par une activation constitutive de la voie de signalisation Sonic Hedgehog (voie SHH). Bien que ils présentent une forte activation de la voie SHH, les cas du jeune enfant et de l'adulte sont des tumeurs différentes aux points de vue clinique et moléculaire (Northcott, Hielscher, et al. 2011). Avec une survie moyenne de 75%, les MB du groupe HH sont de pronostics intermédiaires, se situant entre le groupe WNT de bon pronostic et le groupe 3 de mauvais pronostic. Les cas

adultes sont de moins bons pronostics que les MB HH pédiatriques (Northcott, Hielscher, et al. 2011). De plus ce sous-groupe peut être divisé en trois entités tumorales de pronostics de survie différents : haut risque (20% de survie), risque standard (50% de survie) et faible risque (80% de survie). Ces trois types de MB ont des caractéristiques cytogénétiques et cliniques qui leurs sont propres (Shih et al. 2014).

D'un point de vue histologique, 50% de ces MB sont de type desmoplasique. Tous les MB de type desmoplasique appartiennent au groupe HH et sont de meilleur pronostic chez les enfants de moins de 3 ans. Les 50% restants de MB de groupe HH sont de type classique (22%) ou LC/A (28%). Ces derniers sont de moins bon pronostic et présentent des métastases plus précocement (Ellison et al. 2011).

Les approches thérapeutiques envisagées, en cours de développement, ciblent principalement des acteurs de la voie SHH, par exemple l'utilisation d'un inhibiteur de SMO, le Vismodegib. L'étude clinique de cet inhibiteur devrait être poursuivie en phase 2 (Gajjar et al. 2013).

Altération génétique

Au cours du développement du cervelet, la voie SHH (Figure 14) joue un rôle majeur dans la prolifération des précurseurs des neurones granulaires (GCP) (Dahmane et Ruiz i Altaba 1999; E. Y. Lee et al. 2010; Lewis et al. 2004; Wechsler-Reya et Scott 1999). Le ligand Sonic Hedgehog (SHH) est sécrété par les cellules de Purkinje (Wallace 1999). En l'absence de son ligand SHH, le récepteur transmembranaire Patched (PTCH) réprime l'accumulation du récepteur Smoothed (SMO) dans le cil des progéniteurs neuronaux (Figure 14). Les facteurs de transcription GLI1 et GLI2 sont retenus au sommet du cil et dans le cytoplasme, ou bien ils sont dégradés, sous l'effet répresseur de SUFU. En cas d'activation de la voie, le ligand SHH se fixe à son récepteur PTCH. SMO s'accumule alors au niveau du cil et active la translocation du facteur GLI dans le noyau, où il activera la transcription de gènes cibles de la voie, tels que MYCN, CCND2, PTCH1 (Browd et al. 2006; Yoon et al. 2002).

L'association entre la voie de signalisation SHH et le MB a tout d'abord été identifiée chez des individus atteints par le syndrome de Gorlin. Ils sont porteurs d'une mutation germinale perte de fonction de PTCH. 2% à 5% d'entre eux développent un MB de type nodulaire/desmoplasique durant leur deux premières années de vie (Farndon et al. 1992). Par ailleurs, des mutations germinales du gène suppresseur de tumeur SUFU prédisposent au développement d'un MB de type nodulaire/desmoplasique avant 5 ans (Brugières et al. 2010;

Michael D Taylor et al. 2002). Dans la plupart des cas, le développement de MB est lié à une inactivation bi-allélique de *PTCH* ou *SUFU* (Kool et al. 2014; Robinson et al. 2012).

Un tiers des MB de type HH présente une perte de fonction de *PTCH*, suite à des mutations ou des délétions bi-alléliques de ce gène, avec pour conséquence une activation de la voie SHH (Northcott, Korshunov, et al. 2011). Cette perte de *PTCH* est prédominante dans les MB HH pédiatriques (30%-40%) (Northcott, Hielscher, et al. 2011). Les mutations perte de fonction de *SUFU* ainsi que des mutations gain de fonction de *SMO* et les amplifications de certains gènes cibles de la voie SHH, tels *GLI1*, *GLI2* (Northcott, Hielscher, et al. 2011; Rausch et al. 2012) conduisent à une activation constitutive de la voie SHH. Les tumeurs qui portent une amplification de *GLI2* sont de très mauvais pronostics (Shih et al. 2014).

Des amplifications de *MYCN* sont également été identifiées dans 17,2% des MB pédiatriques. *MYCN* jouerait un rôle central dans l'initiation, la progression et la maintenance de MB. Une étude a montré qu'une forme stabilisée de *MYCN* exprimée dans les cellules souches neurales (CSN) du cervelet est capable d'initier la formation de MB de type HH (Swartling et al. 2012).

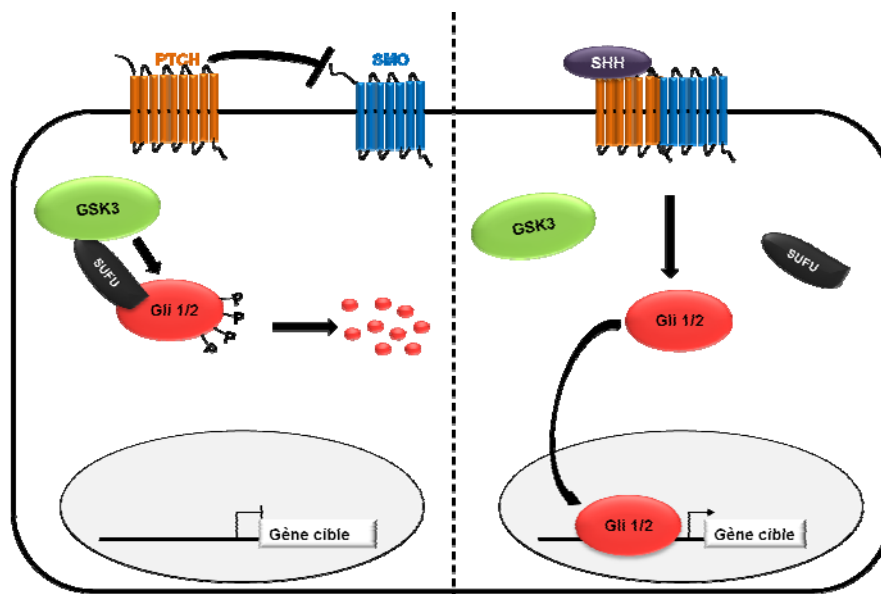


FIGURE 14 : SCHEMA SIMPLIFIE DE LA VOIE HH

(Gauche) En l'absence du ligand SHH (violet), le récepteur Patched (PTCH-marron) inhibe Smoothed (SMO-bleu). GLI1 et 2 (rouge) sont phosphorylés par GSK3 (vert), grâce à SUFU (noir), puis GLI1 et 2 sont dégradés. (Droite) En présence du ligand SHH, SMO n'est plus inhibé. Les facteurs GLI 1 et 2 ne sont plus phosphorylés et sont transloqués dans le noyau où ils activent la transcription des gènes cibles de la voie HH.

Les MB de type HH sont également caractérisés par des mutations de TP53 (21% en moyenne et 56% des MB HH pédiatriques), PTEN (environ dans 20% des MB pédiatriques et adultes) (Kool et al. 2014) et MLL2 (Northcott, Hielscher, et al. 2011; Parsons et al. 2011a). Néanmoins il n'a pas été montré un rôle direct dans l'activation de la voie SHH. Concernant les mutations germinales de TP53 (Syndrome de Li Fraumeni), il a été émis l'hypothèse d'une instabilité génomique due à la mutation germinale de TP53 dans la cellule d'origine de ces MB. Celle-ci conduirait à des remaniements aléatoires qui en touchant des gènes cibles de la voie SHH, pourrait aboutir au développement de MB (Rausch et al. 2012).

Le gène suppresseur de tumeur PTEN est un régulateur négatif de la voie PI3K/AKT (Figure 15). Des mutations perte de fonction ou une délétion de PTEN conduisent à une activation de la voie PI3K/AKT. La voie PI3K/AKT est également activée par d'autres mécanismes, comme par exemple la sécrétion de l'insuline growth factor (IGF) (Del Valle et al. 2002) ou la mutation de la sous-unité catalytique de la PI3K (M. Sun et al. 2010). La mise en évidence de l'implication de la signalisation PI3K/AKT/mTOR (Figure 15) ouvre de nouvelles perspectives thérapeutiques, comme par exemple l'utilisation de la rapamycine ou de PP242, deux inhibiteurs de mTOR, respectivement de mTORC1 et mTORC1/2. En effet, une équipe a conclu que le traitement par l'un ou l'autre de ces inhibiteurs induit un arrêt du cycle cellulaire des cellules de MB (Mohan et al. 2012).

Parallèlement, AKT activée est capable d'inhiber GSK3 (Figure 15). Il est proposé que le synergisme des voies SHH et PI3K/AKT se fait par une régulation de GSK3. En effet GSK3 est capable de phosphoryler MYCN et d'induire sa dégradation par le protéasome (Baryawno et al. 2010). Dans le neuroblastome, il a été montré qu'une inhibition de la voie PI3K/AKT conduit à une activation de GSK3, avec pour conséquence une réduction au niveau protéique de MYCN et CCND1 (Chesler et al. 2006; Johnsen et al. 2008). La perte à l'état hétérozygote de *PTEN* chez des souris ayant une activation constitutive de SMO, modèle murin pour les MB de groupe HH, augmente l'incidence tumorale et diminue la survie (Castellino et al. 2010). Au vue de l'importance de la voie PI3K/AKT/mTOR dans le MB, le traitement par des inhibiteurs de la voie semble être une approche thérapeutique prometteuse, déjà envisagé pour d'autres types de cancer, par exemple ceux du sein (Saura et al. 2014) et du colon (Y.-J. Zhang et al. 2009).

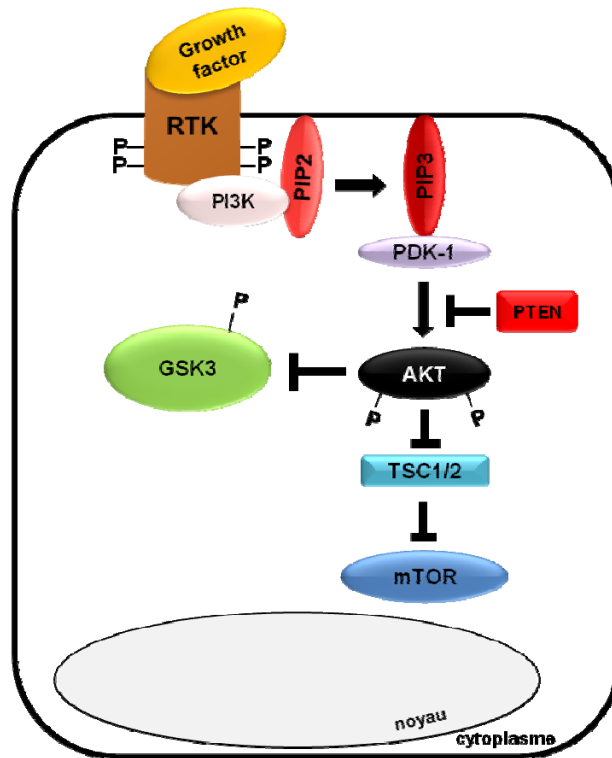


FIGURE 15 : SCHEMA SIMPLIFIE DE LA VOIE PI3K/AKT/MTOR

En présence de facteur de croissance au récepteur tyrosine kinase RTK, PI3K recrute PIP2 (Phosphatidylinositol 4,5-biphosphate), et le phosphoryle pour donner PIP3 (Phosphatidylinositol triphosphate). PIP3 interagit avec PDK1 pour activer AKT, qui active mTOR. De plus AKT inhibe GSK3 par phosphorylation. PTEN inhibe l'activation d'AKT. TSC1/2 inhibe l'activation de mTOR par AKT.

Cellule d'origine

Au cours du développement du cervelet, la voie de signalisation SHH est requise pour la prolifération des GCP (Wechsler-Reya et Scott 1999). Dans le contexte physiologique, les GCP se divisent activement dans l'EGL du cervelet. A un stade donné, les GCP stoppent leur division, et migrent dans l'IGL où ils donnent naissance exclusivement aux neurones granulaires. Une prolifération anarchique des GCP conduit à la formation de MB (Gilbertson et Ellison 2008), suite à des dérégulations activatrices de la voie SHH. Les GCP seraient les cellules d'origine de ce sous-groupe de MB chez l'Homme. En effet, des modèles murins dans lesquels PTCH est inactivé soit spécifiquement dans les GCP, soit dans des cellules souches neuronales du cervelet, indiquent que l'activation constitutive de la voie est oncogénique dans les GCP (Schüller et al. 2008; Z.-J. Yang et al. 2008).

Plusieurs modèles murins différents ont permis de modéliser les MB de groupe HH :

- Délétion germinale de PTCH1

La délétion homozygote de PTCH1 est létale au niveau embryonnaire. A l'état hétérozygote, 14% à 19% des souris développent des MB (Zurawel et al. 2000). Une perte d'hétérozygotie ou mutation de PTCH1 est observée dans une partie de ces MB (Berman et al. 2002; T. G. Oliver et al. 2005). Les autres MB ont conservé l'allèle sauvage de PTCH1 (Wetmore, Eberhart, et Curran 2001; Zurawel et al. 2000). Dans ce modèle, la perte de p53 augmente l'incidence (95%-100%) et réduit la latence (Wetmore, Eberhart, et Curran 2001). Une autre étude propose un modèle différent, en induisant la perte de PTCH1 spécifiquement dans les cellules exprimant ATOH1, c'est à dire majoritairement des GCP. 100% de ces souris développent un MB de type HH (Z.-J. Yang et al. 2008).

- Expression d'une forme active de SMO

Un mutant du domaine transmembranaire de SMO (W539L), placé sous le contrôle du promoteur du gène NeuroD2 (ND2) est exprimé dans les GCP. Une telle mutation active constitutivement la voie de signalisation SHH. Les souris homozygotes ND2 :SMO^{W539L} développent des MB avec une incidence qui atteint 94%. Ces tumeurs sont associées à une dissémination au niveau des leptoméninges. Des métastases à ce niveau sont fréquentes dans les MB humains.

- Délétion de *SUFU* associée à une perte de gène *TP53*

La délétion hétérozygote de *SUFU*, associée à la perte bi-allélique de *TP53* conduit au développement de MB chez plus de la moitié des souris. Le profil d'expression génique de ces MB récapitule l'activation aberrante de la voie SHH (Y. Lee et al. 2007).

3.2.3. Le groupe 4

Caractéristiques cliniques

Le 4^{ème} sous-groupe est le plus représenté (35-40%) et le moins bien caractérisé des quatre sous-groupes. Bien que rare chez les enfants de moins de 3 ans, il apparaît à tous les âges de la vie et est de pronostic intermédiaire (taux de survie à 5 ans de 75%). Les cas adultes montrent néanmoins une survie réduite comparés aux cas pédiatriques.

L'expression du gène KCNA1 (potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, member 1), est utilisée comme marqueur diagnostique de ce sous-groupe (Cho et al. 2011; Northcott, Korshunov, et al. 2011) même si on ignore sa fonction dans les MB de groupe 4. Plus récemment il a été montré que le gène FSTL5 (follistatin-related protein 5), un marqueur de MB de mauvais pronostic, est plus exprimé dans les MB de groupes 3 et 4 (Remke et al. 2011). Ces MB de groupe 4 peuvent être subdivisés en trois types de pronostics différents. L'un de ceux-ci, de faible de risque (1/3 des cas), présente un taux de survie à 5 ans proche de 95% et se caractérise par une isochromosomie 17 (i17q) ou une perte du chromosome 11 (Shih et al. 2014). Il n'existe pas à ce jour de marqueur cytogénétique déterminant de ceux de haut risque (1/3 des cas) et de risque standard (1/3 des cas), qui présentent des taux de survie de 20% et 70% respectivement. Néanmoins la présence de métastases leptoméningées est un facteur de haut risque à l'exception des MB présentant une perte du chromosome 11 ou un gain du 17 (Shih et al. 2014).

D'un point de vue histologique, ces tumeurs sont principalement de type classique (88%), mais il existe quelques cas de type LC/A (10%) et desmoplasique (2%). Les MB de groupe 4 les plus métastatiques sont majoritairement de type LC/A (Northcott, Korshunov, et al. 2011).

Altérations génétiques

La plus fréquente des aberrations retrouvées dans ces MB, est l'isochromosome 17q, mais elle n'est pas spécifique de ce sous-groupe. Plus récemment, il a été décrit un gain du chromosome 5q23.2, région contenant le gène synuclein alpha interacting protein (SNCAIP), dans 10% des cas. SNCAIP code pour la synphilin-1. Exprimé dans les tissus neuronaux, SNCAIP pourrait contrôler le métabolisme cellulaire et serait impliqué dans processus neurodégénératifs. Bien que le rôle oncogénique de synphilin-1 ne soit pas clairement établi, une étude l'identifie comme un oncogène potentiel dans le cancer colorectal (Gylfe et al. 2013). Dans le cadre du MB, SNCAIP est l'un des gènes le plus surexprimés et sa duplication somatique est considérée comme un événement spécifique des tumeurs de groupe 4 (Northcott, Shih, et al. 2012). Occasionnellement, des amplifications de MYCN et de CDK6 sont également rapportées (Northcott, Korshunov, et al. 2011). La duplication de SNCAIP et les autres altérations somatiques du nombre de copies (SCNA) comme par exemple des amplifications de MYCN ou de CDK6 sont mutuellement exclusives (Northcott, Shih, et al. 2012).

Aucune dérégulation de voies de signalisation n'a été encore identifiée dans ces tumeurs. Mais l'étude portant sur l'analyse du génome de plus de 1000 MB (Northcott, Shih, et al. 2012) a cependant permis d'identifier de nouvelles mutations de régulateurs de la voie NF- κ B, tels que NFKBIA (NF- κ B inhibitor- α) et USP4 (Ubiquitin specific protease), spécifiques des MB de groupe 4 (Northcott, Shih, et al. 2012). Les mutations de NFKBIA lèvent l'inhibition de la voie NF- κ B et sont de mauvais pronostics, comme il a été montré notamment dans le glioblastome (Bredel et al. 2011; Westhoff et al. 2013). De plus il a été montré le rôle crucial d'USP4 dans l'inhibition de la voie NF- κ B par la dé-ubiquitination de la protéine TAK1 (Y.-H. Fan et al. 2011). En effet l'ubiquitination de TAK1 est essentielle dans l'activation de la voie NF- κ B (Liang et al. 2013). NFKBIA et USP4 pourraient constituer des cibles thérapeutiques potentielles de ce 4^{ème} groupe, bien que cela ne soit pas validé d'un point de vue fonctionnel (Northcott, Shih, et al. 2012).

L'une des caractéristiques majeures du groupe 4 est l'expression de marqueurs de différenciation neuronale et glutamatergique (Kool et al. 2008; Northcott, Korshunov, et al. 2011). Cela pourrait être dû en partie à des régulations épigénétiques. Ce sous-groupe présente de nombreuses altérations du nombre de copies (SCNA) ou de mutations de gènes codant des protéines de modifications des histones, principalement la H3K27me3 déméthylase KDM6A (13% des cas) et la H3 méthyle transférase MLL3 (5% des cas) (Dubuc et al. 2013). Ces mutations représentent le plus souvent des pertes de fonction. Le grand nombre de modifications épigénétiques retrouvées suggère un rôle essentiel des acteurs du remodelage de la chromatine dans ce groupe de MB. Ces protéines pourraient être des cibles thérapeutiques potentielles. Il a notamment été montré que deux gènes TBR1 et EOMES codant pour des facteurs de transcription à domaine T-box de liaison à l'ADN, présentent des profils de méthylation différents dans le groupe 4 comparés aux autres sous-groupes. TBR1 et EOMES sont connus pour être impliqués dans le développement normal du cervelet, dans la différenciation et la migration des neurones. Ils sont exprimés principalement dans les MB de groupe 4, et leur expression est inversement corrélée dans les tumeurs (Jones et al. 2012). TBR1 et EOMES sont exprimés et nécessaires à différentes étapes de la détermination du lignage neuronal. Ces données suggèrent qu'au sein même des MB de groupe 4, la cellule d'origine serait différente. Ces données pourraient également expliquer l'expression différentielle de marqueurs de différenciation observée dans ces MB (Northcott, Shih, et al. 2012).

Actuellement, ce 4^{ème} sous-groupe étant mal caractérisé, le seul modèle d'étude préclinique disponible, consiste à surexprimer MYCN spécifiquement dans le cervelet, en le plaçant sous le contrôle du promoteur d'un transporteur du glutamate, GLT1 (Swartling et al. 2010). En effet GLT1 est exprimé au cours du développement du rhombencéphale, à partir duquel se développe le cervelet chez les rongeurs (Furuta, Rothstein, et Martin 1997). Ces souris développent des MB non HH, proche des MB de groupe 4 et de type histologique classique ou LC/A.

3.2.4. Le groupe 3

Caractéristiques cliniques

Comparé aux MB des sous-groupes WNT et HH, le même niveau de connaissance est loin d'être atteint pour les MB de groupe 3, qui représentent néanmoins 20% à 25% des MB. Exclusivement pédiatriques (3-10 ans), ces tumeurs sont les MB les plus agressifs, et présentent un fort potentiel métastatique, les définissant comme ceux de plus mauvais pronostic, avec un taux de survie à 5 ans inférieur à 50% (Kool et al. 2012; Northcott, Korshunov, et al. 2011; Shih et al. 2014). Ce sous-groupe peut être subdivisé en deux sous-groupes différents de part leur pronostic différents, leurs altérations génomiques (amplification de c-MYC, isochromosomie 17q-i17q) et leurs caractéristiques cliniques (âge, statut métastatique) (Cho et al. 2011; Pfister et al. 2009). Le pourcentage de survie à 5 ans des MB de risque standard atteint 70%, tandis que celui des MB de haut risque (amplification de c-MYC et/ou i17q et/ou métastase) est de 40%. Plus de la moitié des MB de groupe 3 sont donc de haut risque (Shih et al. 2014).

En clinique, les MB du groupe 3 sont diagnostiqués par un marquage immuno-histochimique positif pour NPR3 (Northcott, Korshunov, et al. 2011). Il est également proposé d'utiliser l'expression du gène de la follistatin like 5 (FSTL5) comme un marqueur de MB non-WNT, non-HH, de mauvais pronostic (Remke et al. 2011). Comme il a été décrit précédemment FSTL5, un marqueur de MB de mauvais pronostic est plus exprimé dans le groupe 3 et dans une moindre mesure dans le groupe 4, par rapport au niveau observé dans les deux autres sous-groupes.

D'un point de vue histologique, les MB sont majoritairement de type classique, mais certains sont de type LC/A. Ces derniers sont de mauvais pronostics (Kool et al. 2012; Northcott, Korshunov, et al. 2011).

Le groupe 3 représente 2/3 des patients atteints de MB pour lesquels une absence de réponse aux traitements est observée. Leur identification constitue donc un défi majeur dans la recherche sur le MB. Une meilleure compréhension, notamment au travers de l'identification de voies de signalisation impliquées pourrait permettre de proposer de nouvelles approches thérapeutiques plus ciblées et de minimiser les effets secondaires causés par des traitements classiques.

Altérations génétiques

Très récemment, le syndrome de Rubinstein-Taybi (SRT), caractérisé par des anomalies congénitales et un déficit intellectuel a été identifié comme le premier syndrome de prédisposition au MB de groupe 3. Il a été rapporté le cas d'un enfant atteint du SRT, suite à la délétion germinale d'une histone acétylase, CREBBP, qui a développé un MB de groupe 3 (Bourdeaut et al. 2014).

Résultants d'une instabilité génomique, des gains (1q, 17q) ou des pertes (5q, 10q, 16q, 17p) chromosomiques sont fréquemment observés dans ce troisième groupe (Northcott, Jones, et al. 2012). La moitié de ces tumeurs sont tétraploïdes. Il a été suggéré que ces réarrangements chromosomiques seraient des événements précoces du développement tumoral (Jones et al. 2012).

- Surexpression de c-MYC

Ces tumeurs se caractérisent dans une grande majorité par une surexpression du proto-oncogène c-MYC. Dans 12% à 16% des cas, cette surexpression s'explique par des amplifications de c-MYC. Elle peut être associée à la fusion de l'exon1 de PVT1 et des exons 2 et 3 de c-MYC. PVT1 code pour 4 microARN, dont MIR-1204, compris dans l'exon 1. MIR1204 a été précédemment identifié comme un oncogène potentiel en combinaison avec c-MYC. La perte de c-MYC ou l'inhibition de miR1204 dans des lignées cellulaires de MB positives pour la fusion PVT1-MYC affecte négativement leur prolifération. Par ailleurs, le promoteur de PVT1 contient des séquences régulatrices de c-MYC, suggérant une boucle d'autorégulation positive de c-MYC lui-même sur l'expression de ce gène de fusion (Carramusa et al. 2007; Northcott, Shih, et al. 2012).

Plus récemment, il a été mis en évidence que l'expression de c-MYC est régulée dans le MB par des microARN, par exemple MIR-33b localisé en 17p11 et MIR-512.2 localisé en 19q13 (Lv et al. 2012). Le bras court (p) de l'un des chromosomes 17, portant MIR-33b est perdu dans un nombre non négligeable de MB de groupe 3. Une étude a montré que la surexpression

de ce microARN dans des lignées de MB affecte l'expression de c-MYC ainsi que la prolifération (Takwi et al. 2012). La perte de MIR512.2 est également associée à une diminution de l'expression de c-MYC dans des lignées de MB (Lv et al. 2012).

Dans le MB, l'expression de c-MYC est régulée par des facteurs épigénétiques, tels que les protéines BET. Celles-ci reconnaissent les lysines acétylées des histones au niveau des promoteurs et permettent le recrutement de régulateurs de la transcription. Des études récentes les ont identifiées et plus particulièrement BRD4, comme des régulateurs directs de l'expression de MYC et de ses gènes cibles dans le MB (Henssen et al. 2013). Une autre étude montre que l'inhibition des protéines BET dans des lignées cellulaires de MB induit une perte de l'expression de c-MYC associée à une diminution de la viabilité de ces cellules. L'inhibition des BET pourrait constituer une nouvelle stratégie thérapeutique de MB, dans lesquels c-MYC est surexprimé (Bandopadhyay et al. 2014).

- Surexpression d'OTX2

Ce troisième sous-groupe se caractérise également par une surexpression d'OTX2, due dans 7% des cas à une amplification de ce gène. Notons qu'OTX2 est fortement exprimé dans tous les sous-groupes de MB, à l'exception du groupe HH. Une approche par shARN a montré qu'OTX2 joue un rôle dans la prolifération en régulant l'expression de gènes impliqués dans le cycle cellulaire (Bunt et al. 2012). Bien que les amplifications de c-MYC et OTX2 soient mutuellement exclusives, c-MYC et OTX2 sont néanmoins co-exprimés dans les MB de groupe 3. Ils pourraient interagir et entrer en synergie pour réguler l'expression de gènes importants pour la carcinogenèse du MB. La comparaison des sites de fixation d'OTX2 et c-MYC, a permis de mettre évidence une proximité des sites de fixation d'OTX2 et c-MYC dans le promoteur de certains gènes dans le contexte du MB (Bunt et al. 2011).

- Dérégulation de la voie TGFβ/Activine

Une analyse génomique récente portant sur plus de 1000 MB a montré que différents acteurs des voies de signalisation du TGFβ/Activine (Figure 16) sont dérégulés dans 20% des MB de groupe 3 (Northcott, Shih, et al. 2012). Les gènes TGFBR1, codant le récepteur de type I aux TGFβ, ACVR2A et ACVR2B, codant des récepteurs de type II à l'Activine, sont amplifiés spécifiquement dans ce sous-groupe. Ces trois récepteurs activent la même voie de signalisation intracellulaire faisant intervenir les médiateurs SMAD2 et SMAD3 (SMAD2/3). A l'inverse des inhibiteurs de la voie, tels que CD109, FKBP1A, sont fréquemment perdus.

Ces données suggèrent que la dérégulation de la voie TGFβ/Activine est un événement initiateur de la tumorigénèse de ces MB de mauvais pronostic. Il est clairement établi que la voie de signalisation TGFβ peut exercer des rôles de suppresseur de tumeur ou d'oncogène dans les processus cancéreux (Massagué 2008; Meulmeester et Ten Dijke 2011). Dans le cancer du côlon ou du pancréas, différents acteurs de la voie de signalisation TGFβ sont mutés, conduisant à leur inactivation. Dans d'autres types de cancers tels que celui de la prostate, du sein ou le glioblastome, cette voie de signalisation est activée et requise pour le processus tumoral et métastatique. L'un des projets menés actuellement au laboratoire, tente de déterminer d'un point de vue fonctionnel, l'implication de la voie TGFβ dans les MB de groupe 3. Si tel est le cas, l'inhibition de cette voie pourrait constituer une nouvelle approche thérapeutique.

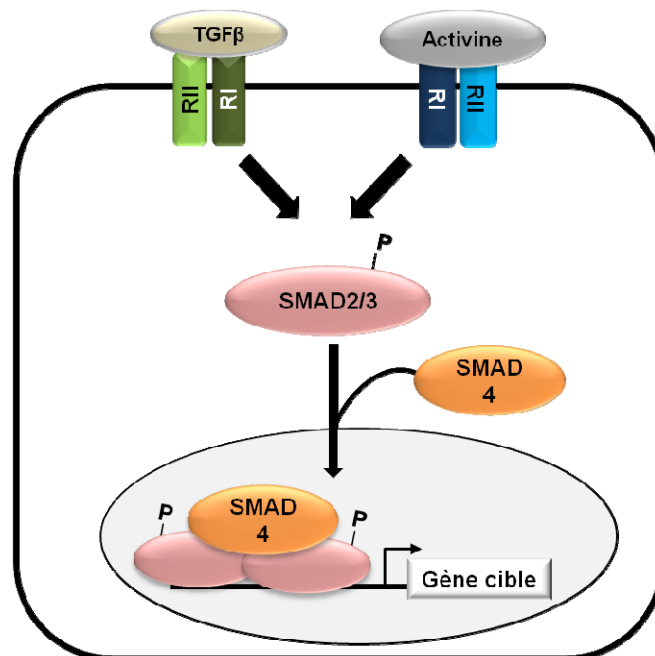


FIGURE 16 : SCHEMA SIMPLIFIE DE LA VOIE CANONIQUE TGFβ/ACTIVINE.

Le TGFβ et l'Activine par l'intermédiaire de leurs récepteurs spécifiques activent les mêmes médiateurs intracellulaires, les protéines Smad2/3. SMAD2/3 actives s'associent à SMAD4 afin d'activer les gènes cibles de la voie.

- Expression du programme de différenciation spécifique des photorécepteurs

Le sous-groupe 3 montre une caractéristique très surprenante, le différenciant des autres types de MB. Il exprime un ensemble de gènes dont l'expression est exclusive à un type cellulaire de la rétine, les photorécepteurs et absente du cervelet. Ce programme est caractérisé par exemple par l'expression des gènes CRX, NR2E3, TULP1, PDE6H et NRL (Cho et al. 2011;

Kool et al. 2008; Northcott, Korshunov, et al. 2011). Au cours du développement normal de la rétine, la protéine OTX2 régule en partie l'expression de certains de ces gènes impliqués dans la différenciation terminale des photorécepteurs. Bien qu'il soit surexprimé dans les MB de groupe 3, la régulation de la surexpression de ce programme n'a pas été mise en évidence dans ces tumeurs. Il a été proposé que la surexpression de miARN (miR183/96/182) qui lui est associée pourrait expliquer la présence de cette marque photorécepteur (Cho et al. 2011; Loscher et al. 2008). Ce programme est considéré comme une marque de différenciation aberrante ne participant pas au processus tumoral mais résultant de la plasticité des cellules cancéreuses. Une partie de mon projet de thèse vise à déterminer au travers de l'étude du facteur de transcription NRL, si une partie de ce programme de différenciation spécifique des photorécepteurs joue un rôle dans la carcinogénèse de MB agressifs.

Modèles

La cellule d'origine des MB de groupe 3 n'est pas identifiée. Néanmoins deux modèles précliniques ont été développés. Ils sont basés sur la surexpression de c-MYC. Le premier modèle consiste dans la surexpression de c-MYC dans une population neuronale de la substance blanche. Ces cellules sont isolées à partir de cervelets murins postnataux sur la base de l'expression de Prom1/CD133, un marqueur de cellules souches. La surexpression de c-MYC dans ces cellules induit une prolifération intense et transitoire mais ne suffit pas au développement de MB. Les événements oncogéniques coopérant avec c-MYC pour la formation des tumeurs appartenant au groupe 3 n'ont pas encore été identifiés. Cependant l'expression ectopique de c-MYC associée à une perte bi-allélique de TP53 dans ces cellules conduit à la formation de tumeurs, de type histologique LC/A, dont le profil d'expression génique est comparable à celui de MB de groupe 3 (Pei et al. 2012). La même année, un second modèle fondé également sur la surexpression de c-MYC dans un contexte où TP53 est perdu a été publié. Les auteurs surexpriment c-MYC dans des GCP isolés à partir de cervelets post-nataux de souris homozygotes pour la perte de TP53. De manière comparable au premier modèle, ces cellules une fois réinjectées dans le cervelet de souris immunodéficientes sont capables de former des tumeurs similaires au MB de groupe 3 (Kawauchi et al. 2012). Ces deux études identifient la surexpression de c-MYC comme un événement oncogénique majeur pour les MB du groupe 3. La surexpression de c-MYC doit cependant être couplée à un événement anti-apoptotique pour jouer son rôle oncogénique. Il est important de noter que le gène TP53 n'est pas muté/altéré dans les MB de groupe 3 à l'inverse d'autres sous-groupes.

De ce fait, il ne constitue cet événement anti-apoptotique dans les MB humains de groupe 3. De part son rôle majeur dans le MB c-MYC constitue une cible thérapeutique potentielle, par la régulation de son expression ou par l'inhibition de ses interactions avec ses partenaires protéiques.

3.3. Cellule souche tumorale et MB

Aujourd'hui, la vision d'une tumeur constituée de cellules cancéreuses identiques laisse place à celle d'une tumeur hétérogène. Les tumeurs cérébrales ne font pas exception. Bien que l'origine de cette hétérogénéité intratumorale ne soit pas clairement identifiée, il a été suggéré que les différentes populations cellulaires présentes dériveraient d'une population minoritaire de cellules pluripotentes, appelées cellules souches cancéreuses (CSC).

Les cellules souches neurales (CSN) se caractérisent par leur capacité d'auto-renouvellement, leur potentiel restreint de différenciation en cellules neurales et l'expression de marqueurs spécifiques, par exemple CD133, CD15, Sox2 et Nestin (A. Lee et al. 2005). *In vitro*, elles forment des neurosphères en présence de facteurs de croissance particuliers, par exemple l'EGF (Epidermal Growth Factor) et le FGF (Fibroblast Growth Factor) (Reynolds et Weiss 1992). Des CSN ont été isolées à partir de cervelets murins post-natal. Ces cellules qui ne sont pas les progéniteurs de neurones granulaires (GCP), ont les capacités d'auto-renouvellement et de différenciation en différents types cellulaires (neurone, astrocyte, oligodendrocyte) *in vitro* et *in vivo* après transplantation. Ces cellules sont isolées sur la base de l'expression de marqueurs CD133 (CD133+) et l'absence d'expression des marqueurs neuronaux et gliaux (O4/PSA-NCAM/TAPA-1).

Bien que les CSC ne soient pas des cellules souches, elles en possèdent certaines caractéristiques, comme cela a été montré dans des tumeurs cérébrales (Clarke et al. 2006; Singh et al. 2003). En effet, elles sont capables de s'auto-renouveler et de se différencier. Par ailleurs, les CSC expriment certains marqueurs de CSN. Des CSC ont été isolées à partir de glioblastomes sur la base de l'expression du marqueur CD133. Plus récemment, une équipe a isolé des cellules qui possèdent des propriétés de cellules souches d'un grand nombre de tumeurs cérébrales pédiatriques (Thirant et al. 2011). Des cellules de gliome de l'adulte par exemple expriment trois marqueurs de CSN : CD133, CD44 et CD15, mais possèdent des capacités d'auto-renouvellement *in vitro* différentes en fonction des tumeurs (Patru et al. 2010). De plus une autre équipe a isolé des CSC, dans des tumeurs développées par les souris

Ptch1+/-, sur la base de l'expression du marqueur CD15 (Ward et al. 2009). Rappelons que ces tumeurs sont des MB de groupe HH.

Les CSC peuvent être cultivées et maintenues *in vitro* en présence d'EGF et de FGF comme pour les CSN normales essentiellement sous forme de neurosphères. Il a également été décrit que les CSC peuvent être maintenues dans des conditions d'adhérence (Pollard et al. 2009). Les tumeurs cérébrales ne sont pas toutes équivalentes en termes de quantité et des propriétés de leurs CSC. Ainsi toutes les CSC ne peuvent pas être maintenues *in vitro*. *In vivo*, les CSC, réimplantées chez la souris, sont capables d'initier la formation d'une tumeur (Thirant et al. 2011; Ward et al. 2009).

Il a été suggéré que des CSN seraient les cellules d'origine de certaines tumeurs cérébrales (Hemmati et al. 2003). En effet le maintien de leur capacité d'auto-renouvellement augmente la proportion de mutations possibles, et notamment un événement oncogénique qui conduirait à la tumorigénèse. Comme décrit précédemment, un modèle d'étude de MB de groupe 3 a été mis au point, en surexprimant c-MYC dans ces cellules isolées à partir de cervelets de souris délétées pour le gène TP53 (modèle décrit lors de la description du groupe 3 de MB : Pei, Cancer cell, 2012). Ces cellules seraient une population de CSN du cervelet.

Il a été mis en évidence que les trois voies de signalisation : SHH, WNT et NOTCH coopéraient dans l'autorenouvellement des CSN et des CSC (Garzia et al. 2009; Taipale et Beachy 2001) (Figure 17). La dérégulation de ces trois voies converge vers la surexpression du gène *BMII*, impliqué dans le remodelage de la chromatine et est à l'origine de certains groupes de MB. De plus, BMI1 régule le renouvellement des CSN (Bruggeman, Genes Dev, 2005) et des CSC (Abdouh et al. 2009 ; Venugopal et al., 2012).

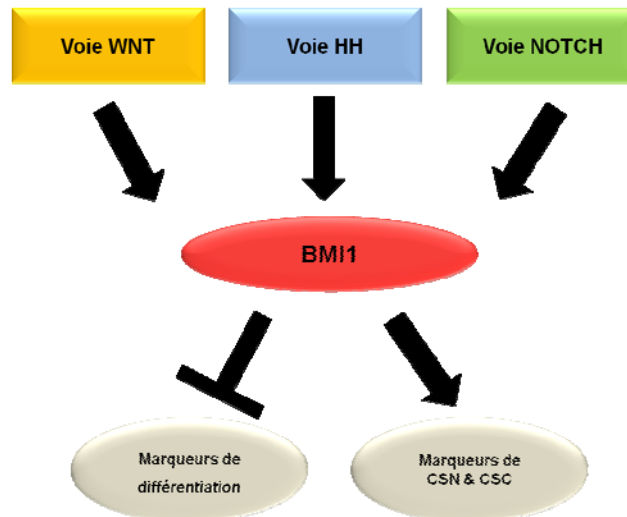


FIGURE 17 : BMI UN ACTEUR CLE DE LA MAINTENANCE DE L'ETAT SOUCHE DES CELLULES.

Les 3 voies : WNT (jaune), HH (bleu) et NOTCH (vert) régulent l'expression du facteur de remodelage de la chromatine BMI1. BMI1 inhiberait l'expression des marqueurs de différenciation et favoriserait celle des marqueurs de CSN et CSC

Bien que la cellule d'origine des MB HH soit les GCP, des CSC ont été identifiées dans ces MB. En effet dans des tumeurs issues du modèle murin *PTCH1^{+/-}* décrit précédemment, il a été retrouvé des cellules ressemblant aux CSC qui expriment le marqueur de cellules souches CD15. Ces cellules représentent une faible proportion des GCP car elles expriment également le gène *Math1*, exprimé spécifiquement dans les GCP. Elles prolifèrent sous l'action de SHH mais ne peuvent ni se différencier ni former des neurosphères (Read et al. 2009). Une autre équipe a identifié une sous-population de cellules exprimant CD15 capable d'initier les MB de ce sous-groupe (Ward et al. 2009). Les MB des sous-groupes 3 et 4 expriment également des marqueurs de cellules souches (Northcott, Korshunov, et al. 2011), ce qui suggère la présence d'une proportion plus importante de CSC. Bien que la cellule d'origine de ces MB ne soit pas identifiée, ce pourrait être les cellules souches du cervelet (Pei et al. 2012).

Enfin la présence d'une quantité élevée de CSC dans les tumeurs est souvent associée à un mauvais pronostic. Ces CSC seraient résistantes aux thérapies (radiothérapie et chimiothérapie), et la cause des récurrences. Avec l'émergence des thérapies ciblées, il devient essentiel de mieux caractériser ces CSC afin de développer des traitements capables de les éliminer. Contrairement au glioblastome les CSC de MB sont encore mal caractérisées. Elles posséderaient des marqueurs différents en fonction des sous-groupes de MB. Plusieurs

approches sont à l'étude, comme par exemple celle des inhibiteurs de la γ -sécrétase, impliquée dans la voie NOTCH (X. Fan et al. 2006) ou des microARN inhibiteurs de cette voie (Garzia et al. 2009).

4. Apoptose et cancer

4.1. Les voies de l'apoptose

L'apoptose est un processus de mort cellulaire programmée, indispensable au développement normal des organismes. Les cellules en apoptose présentent alors des caractéristiques morphologiques particulières comme la condensation du cytoplasme, du noyau, de la chromatine et une fragmentation de l'ADN. Il y a également formation de corps apoptotiques qui seront digérés par les macrophages. Toutes les cellules normales ont la capacité d'enclencher ce programme dit de « suicide », en réponse à divers signaux extra- ou intracellulaires. L'apoptose est gouvernée par trois voies d'activation :

- une voie dite extrinsèque ou voie des récepteurs de mort de la superfamille des facteurs de nécrose tumorale (TNF)
- une voie dite intrinsèque ou voie mitochondriale impliquant les protéines « B-cell lymphoma 2 » (BCL-2)
- une voie intrinsèque dite du réticulum endoplasmique.

Tout d'abord les voies extrinsèque et mitochondriale de l'apoptose seront brièvement présentées. Mon travail de thèse m'a conduit à étudier l'un des membres de la famille BCL-2. C'est pourquoi seule l'implication des dérégulations de la voie mitochondriale, à travers des altérations des protéines de la famille BCL-2 dans les cancers, sera développée par la suite.

4.1.1. Voie extrinsèque ou voie des récepteurs de mort

La voie extrinsèque est initiée par la liaison d'un ligand pro-apoptotique au niveau de son récepteur transmembranaire, appelé récepteur de mort (Ashkenazi et Dixit 1998) (Figure 18-bleu). Ces ligands appartiennent à la superfamille TNF, constituée de 14 membres dont les

plus connus sont le TNF- α , FasL, Apo2L/TRAIL (Apoptosis Ligand 2/Tumor necrosis factor Related Apoptosis-Inducing Ligand). Parmi les récepteurs de mort, sont retrouvés les récepteurs au TNF (TNFR1 et 2) et Fas correspondant respectivement aux ligands TNF- α et FasL, caractérisés par un domaine extracellulaire riche en cystéine, impliqués dans la liaison du ligand, un domaine transmembranaire et un domaine de mort (DD) intracellulaire qui est responsable de la transmission du signal de mort (Chaigne-Delalande, Moreau, et Legembre 2008; Wajant, Pfizenmaier, et Scheurich 2003). La liaison du ligand à son récepteur induit la trimérisation de ce dernier et a pour conséquence le recrutement de protéines associées au domaine DD des récepteurs de mort (TRADD et FADD, les protéines adaptatrices respectives de TNFR et Fas). Le complexe inducteur du signal de mort (DISC) est ainsi formé. Au sein du DISC, les protéines adaptatrices (TRADD et FADD) recrutent la pro-caspase 8 grâce à leur domaine effecteur de mort (DED) en permettant ainsi la dimérisation et la transactivation de la caspase initiateur, la caspase 8. Sous forme active, la caspase 8 initie l'apoptose en activant la caspase 3 par clivage.

4.1.2. Voie intrinsèque ou voie mitochondriale

Les stress cellulaires, tels que les stress chimiques (hypoxie, drogues), les radiations, les dommages de l'ADN, privation en facteurs de croissance, sont souvent associés à la mort impliquant la voie mitochondriale de l'apoptose (Figure 18-rouge). La famille BCL-2, constituée de protéines pro- et anti-apoptotiques joue un rôle clé dans la régulation de cette voie. L'induction de cette voie apoptotique conduit à la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe (MME), permettant ainsi la libération des protéines effectrices, séquestrées dans l'espace inter-membranaire mitochondrial (EIM). Libérées dans le cytosol, ces molécules déclenchent l'activation des caspases 9 et 3 (Danial et Korsmeyer 2004).

Les facteurs pro-apoptotiques de l'EIM comprennent le cytochrome c, le facteur inducteur de l'apoptose (AIF), l'endonucléase G (endoG), Smac/DIABLO, HtrA2/Omi (Kroemer, Galluzzi, et Brenner 2007).

Au sein de l'EIM, le cytochrome c est impliqué dans le transport des électrons de la chaîne respiratoire. Une fois libéré dans le cytosol, il s'associe avec le facteur activateur de protéase apoptotique-1 (Apaf1) et la pro-caspase 9, pour former « l'apoptosome ». Ce complexe active la caspase 3. Le facteur AIF quant à lui, agirait au niveau du noyau, où il activerait des nucléases. Ces nucléases, ainsi que d'autres endonucléases, telles que l'endoG fragmentent l'ADN. Smac/DIABLO ou Omi/HtrA2 participent à l'activation des caspases en interagissant

avec les protéines inhibitrices de l'apoptose (IAP), normalement liées aux caspases 3 et 9. La protéine Smac/DIABLO s'associe aux protéines IAP conduisant à leur séquestration ce qui a pour conséquence une inhibition de leur fonction anti-apoptotique dans le cytosol (Du et al. 2000). La protéase Omi/HtrA2, quant à elle, inhibe l'action des IAP en induisant leur clivage protéolytique (Hegde et al. 2002).

Les voies extrinsèques et intrinsèques convergent vers l'activation de la caspase 3 qui clive le complexe ICAD (Inhibitor of caspase-activated DNase)/CAD (caspase-activated DNase) conduisant à la libération des CAD, qui fragmentent l'ADN. D'autre part la caspase 3 active va cliver et activer d'autres caspases, comme les caspases 6 et 7. Toutes ces caspases clivent des kinases, des protéines du cytosquelette, de réparation de l'ADN, des régulateurs du cycle cellulaire conduisant aux manifestations morphologiques propres à l'apoptose.

Cette voie peut être activée par la voie extrinsèque. En effet dans les cellules caractérisées par la formation d'un faible nombre de complexe DISC, la caspase 8 active peut induire indirectement l'apoptose, en clivant et en activant la protéine pro-apoptotique à domaine BH3 only (BID). La forme tronquée de BID (tBID) est relocalisée au niveau de la mitochondrie où elle participe aux mécanismes responsables de la libération des molécules pro-apoptotiques (Barnhart et al. 2003).

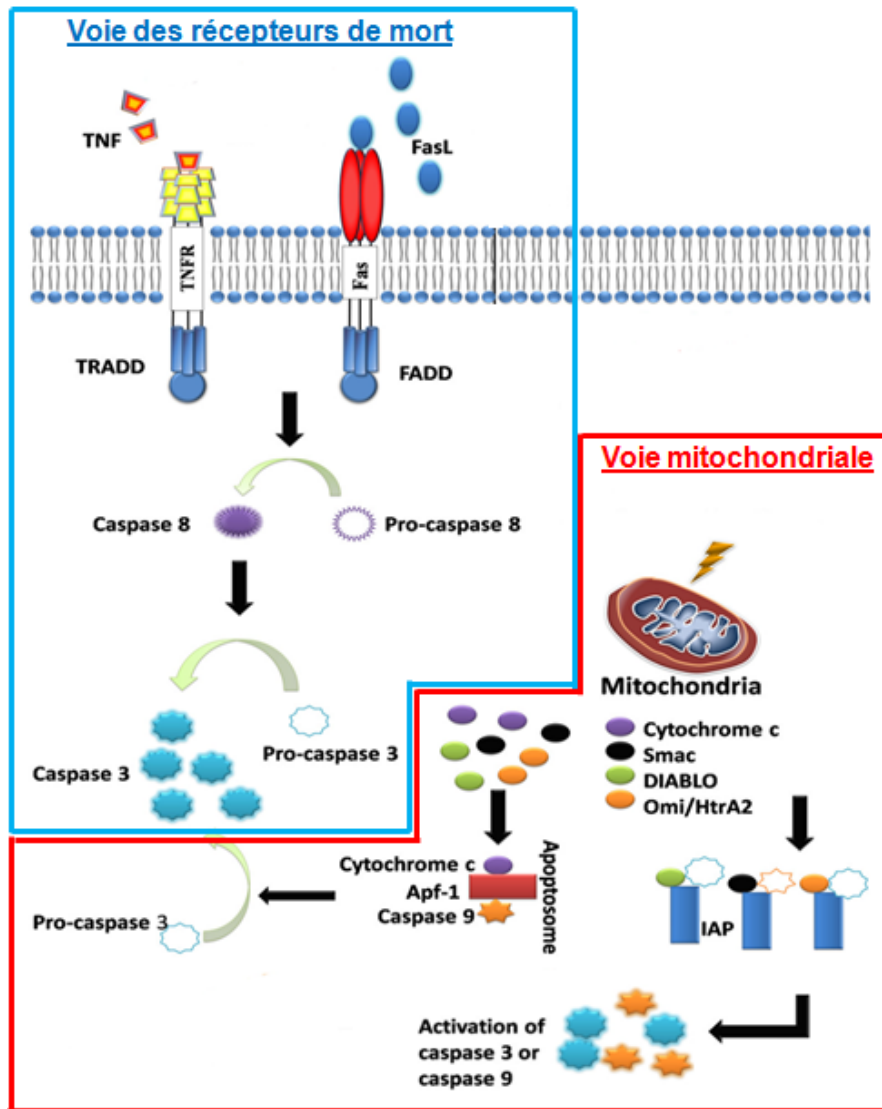


FIGURE 18 : LES DIFFERENTES VOIES DE L'APOPTOSE

(Adapté de Wong 2011). La voie extrinsèque ou voie dite de récepteurs de mort (bleu) et la voie mitochondriale (rouge) convergent vers l'activation de la caspase 3. (Pour plus de description se conférer au texte ci-dessus)

4.2. La famille des protéines BCL-2 et cancer

La famille des protéines BCL-2 joue un rôle essentiel dans l'apoptose. Identifiée dans les années 1980, elle tire son nom de son membre fondateur, Bcl-2 (« B cell lymphoma 2 »), une oncoprotéine surexprimée suite à sa translocation t(14 ;18) dans le lymphome folliculaire humain à cellules B (Bakhshi et al. 1985; Cleary, Smith, et Sklar 1986; Tsujimoto et al. 1984).

4.2.1. Les membres de la famille Bcl-2 et leur activité

Depuis sa découverte, une trentaine de membres ont été identifiés chez les eucaryotes. Au sein de cette famille coexistent des protéines aux fonctions pro- et anti-apoptotiques, pouvant être classées en trois groupes, selon leur composition (Figure 19). L'alignement de leurs séquences protéiques a en effet permis de définir quatre régions de forte conservation appelées domaines BH (*Bcl-2 homology*), définissant ainsi trois catégories de protéines BCL-2.

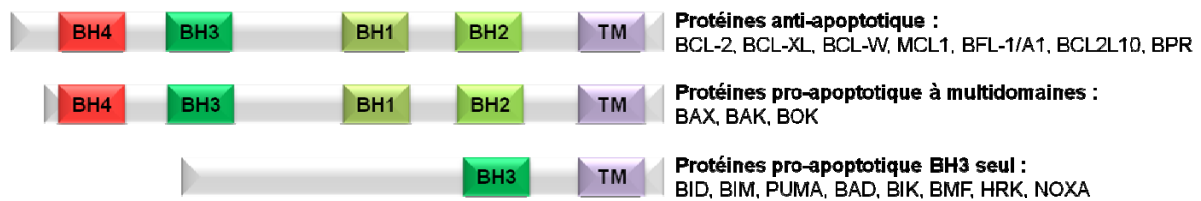


FIGURE 19 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES MEMBRES DE LA FAMILLE BCL-2

(Adapté de Moldoveanu et al. 2014) Les protéines BCL-2 ont en commun un domaine transmembranaire (TM) et le domaine d'homologie BH3, mais certaines possèdent 3 domaines BH₁₋₄ additionnels. Le « core » des protéines est représenté en gris.

Les protéines anti-apoptotiques

Le premier groupe comprend des protéines anti-apoptotiques : BCL-2, BCL-XL (BCL2L1), BCL-W (BCL2L2), MCL1 (BCL2L3), BFL-1/A1 (BCL2L5), BCL2L10 et BPR (BCL2L12). Ces membres ont une structure tertiaire comparable et se caractérisent également par leurs quatre domaines BH (BH₁₋₄) et un « core ». Il est proposé que ces domaines BH forment une structure globulaire composée d'hélices alpha, comportant une poche hydrophobe (Muchmore et al. 1996; A M Petros et al. 2001). Des expériences de mutagenèse de ces domaines conduisent à une ablation de leur rôle anti-apoptotique (Verhagen et al. 2000). Le domaine BH4, le moins conservé des domaines BH, serait impliqué dans la survie des cellules, en inhibant l'apoptose (D. C. Huang, Adams, et Cory 1998) et plus largement dans l'autophagie, le transport du calcium ou l'angiogenèse, par des interactions protéine-protéine impliquant le « core » et des changements conformationnels. Il faut cependant noter qu'il existe un variant d'épissage de BCL-XL, qui code pour BCL-XS. Ce dernier possède les domaines BH 3 et 4 mais est dépourvu des domaines BH 1 et 2. BCL-XS joue un rôle pro-apoptotique, en inhibant la fonction anti-apoptotique de BCL-XL (Chang et al. 1999).

Les protéines pro-apoptotiques à multidomaines

Ce second groupe, est constitué des protéines pro-apoptotiques : BAX (BCL2L4), BAK (BCL2L7) et BOK (BCL2L9). Ces protéines sont caractérisées par la présence de 4 domaines BH (BH₁₋₄) et sont considérées comme les effecteurs de l'apoptose. Tout comme les membres anti-apoptotiques, les 3 domaines BH formeraient une structure globulaire.

Les protéines pro-apoptotiques à domaine BH3 seul

Caractérisé par la seule présence du domaine BH3, ce troisième groupe comprend les membres : BAD (BCL2L8), BID, BIK, BIM (BCL2L11), BMF, HRK, NOXA, PUMA. Parmi eux, les sensibilisateurs (BAD, BIK, HRK, NOXA) exercent leur fonction pro-apoptotique uniquement en inhibant les protéines anti-apoptotiques et d'autres, les activateurs (BID, BIM, PUMA) sont capables d'inhiber les membres anti-apoptotiques et d'activer directement les effecteurs par l'induction de changements conformationnels (Bras, Queenan, et Susin 2005; Green et Chipuk 2008; Juin et al. 2013; Youle et Strasser 2008).

4.2.2. Mécanismes d'action des protéines de la famille BCL-2

Dans ce chapitre, le mécanisme d'action décrit pour les protéines BCL-2 sera restreint à la voie canonique (Figure 20). Ces dernières années, il a été mis en évidence un rôle des protéines de la famille BCL-2 dans la régulation des mécanismes différents de l'apoptose, comme par exemple dans la sénescence ou l'autophagie qui ne seront pas décrit.

Les protéines pro-apoptotiques activatrices possédant un domaine BH3 seulement (BID, BIM et PUMA), d'une part activent les protéines pro-apoptotiques BAX et BAK par des changements conformationnels et d'autre part se lient aux protéines anti-apoptotiques. Une fois activées, BAK et BAX vont s'oligomériser pour former un pore dans la MME et induire ainsi sa perméabilisation (Figure 20). Les protéines anti-apoptotiques BCL-2 sont capables de se lier et d'inhiber BAK et BAX, ainsi que les protéines activatrices à domaine BH3 seul. Enfin les protéines pro-apoptotiques sensibilisatrices constituées d'un domaine BH3 seul, n'activent pas directement BAK et BAX mais entrent en compétition avec elles, afin de se lier aux protéines anti-apoptotiques (Czabotar et al. 2014; Juin et al. 2013; Moldoveanu et al. 2014). Etant donnée cette régulation, il semble que le contrôle de l'apoptose soit le résultat de la balance entre les protéines anti et pro-apoptotiques de la famille de BCL-2.

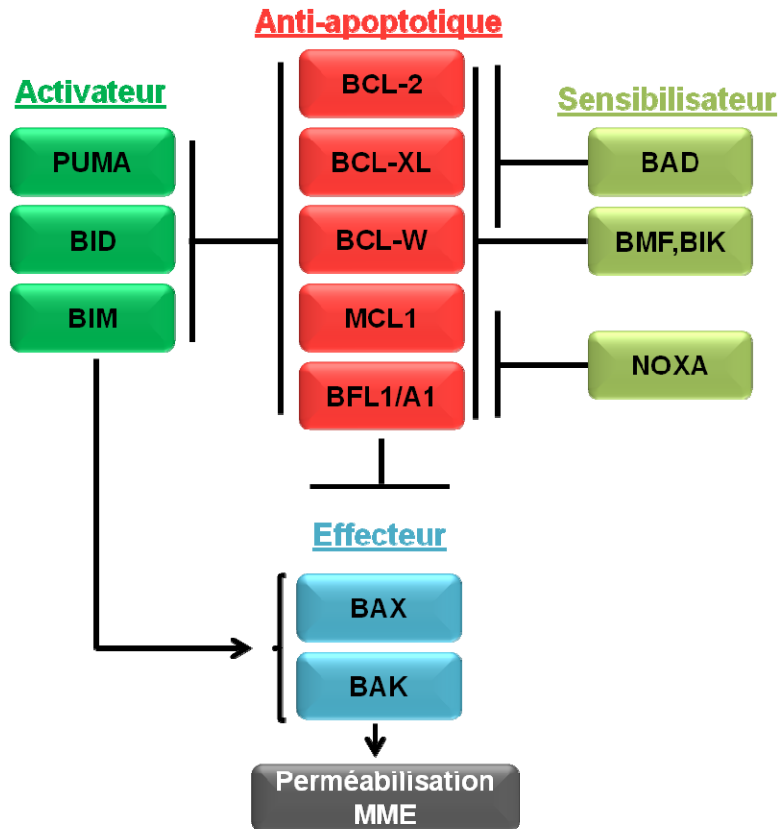


FIGURE 20 : REGULATION DE L'APOTOSE PAR LES MEMBRES DE LA FAMILLE BCL-2

(Adapté de Liu et Wang 2012) Les protéines anti-apoptotiques (rouge) inhibent les effecteurs (bleu) soit directement, soit indirectement en inhibant les activateurs (vert-gauche). Les activateurs peuvent inhiber les protéines anti-apoptotiques et activent les effecteurs. Les sensibilisateurs (vert-droite) favorisent l'apoptose en inhibant les protéines anti-apoptotiques. Les effecteurs activés induisent la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe (MME). La perméabilisation de la MME conduit à l'apoptose des cellules.

Des études ont contribué à mettre en évidence l'importance des domaines BH 1 à 3 pour l'interaction des protéines de la famille BCL-2 entre elles (Verhagen et al. 2000). En effet les domaines BHs des membres anti-apoptotiques et pro-apoptotiques à multidomaines, peuvent former une poche hydrophobe, capable d'accueillir le domaine BH3 des autres protéines pro-apoptotiques (Chipuk et al. 2010; Andrew M Petros, Olejniczak, et Fesik 2004). La « signature » des contacts hydrophobes et électrostatiques définit l'affinité, la sélectivité et la spécificité des interactions entre les membres de la famille BCL-2 (Day et al. 2008; Ku et al. 2011; A M Petros et al. 2000). Il a notamment été montré que le domaine BH3 de la protéine BAK est nécessaire à sa liaison à son antagoniste BCL-XL et serait nécessaire à la fonction pro-apoptotique de BAK (Holinger, Chittenden, et Lutz 1999). Par ailleurs, la protéine

activatrice PUMA, un gène cible de P53, aurait un rôle dans la régulation de l'activité pro-apoptotique de P53, indépendamment de son activité transcriptionnelle (Chipuk et al. 2004). En effet, P53 est séquestré dans le cytosol par sa liaison au core de BCL-XL, or PUMA est capable de se lier à BCL-XL grâce à son domaine BH3 et induit un changement conformationnel de BCL-XL. Ce changement permet la libération de P53 (Follis et al. 2013). Bien que P53 ne possède pas de domaine BH3, il est capable d'activer les effecteurs BAK (Leu et al. 2004) et BAX (Chipuk et al. 2004).

En plus de leurs domaines BHs, une majorité des protéines de la famille BCL-2 possèdent un domaine C-terminal transmembranaire (TM) qui permet leur ancrage aux membranes mitochondriale, réticulaire et nucléaire (Akao et al. 1994; Hsu, Wolter, et Youle 1997; Nguyen et al. 1993). Il a été proposé que cette capacité d'insertion soit liée à leur similitude de structure avec certaines toxines bactériennes, leur permettant de former des canaux/pores transmembranaires modulant ainsi la libération de protéines pro-apoptotiques mitochondriales. Il paraît donc essentiel que ces protéines effectrices soient ancrées à la membrane de la mitochondrie. Du fait de son repliement qui expose sa queue hydrophobe C-terminale, il est suggéré que BAK soit constamment ancré à la membrane (Gavathiotis et al. 2010; M. Suzuki, Youle, et Tjandra 2000). BAX quant à lui, résiderait dans le cytosol puis serait transloqué à la membrane mitochondriale suite à un changement conformationnel (Lalier et al. 2007). Il a été montré que BCL-XL exerce également un rôle anti-apoptotique en inhibant la translocation constante de BAX dans le cytosol (Edlich et al. 2011). Il est proposé que le domaine BH4 leur permette d'interagir avec leurs partenaires, et de jouer un rôle dans la survie cellulaire.

De manière schématique, les protéines pro-apoptotiques BAK et BAX sont les effecteurs terminaux du déclenchement du processus apoptotique. Ces dernières peuvent être inhibées par les protéines anti-apoptotiques. L'inhibition de l'ensemble de ces protéines anti-apoptotiques n'est cependant pas suffisante pour induire la mort des cellules. En effet, ce processus nécessite la présence des protéines activatrices à un domaine BH3 seul, qui activent les membres BAK et BAX.

4.3. Dérégulation de l'apoptose dans l'oncogénèse

L'inhibition anormale de l'apoptose a été identifiée comme jouant un rôle majeur dans la tumorigénèse. De nombreuses dérégulations de ces voies sont observées dans les processus cancéreux. En effet, elles permettent en effet aux cellules cancéreuses de survivre dans des conditions défavorables, par exemple dans les cas de carences en facteurs de croissance ou d'hypoxie, et d'acquérir de nouvelles altérations génétiques (Ionov et al. 2000; J C Reed 1999). Dans les cancers, l'abolition de l'apoptose agirait en complément de la dérégulation d'oncogènes, par exemple c-MYC (Green et Evan 2002) et favoriserait les processus métastatiques et la résistance au traitement. En effet, la grande majorité des drogues cytotoxiques utilisées en clinique induisent l'apoptose des cellules tumorales. Cette conséquence est contrecarrée par un défaut de l'apoptose.

Des dérégulations peuvent intervenir à différents niveaux des voies intrinsèques et extrinsèques, par exemple des mutations inactivatrices d'inducteurs de l'apoptose tels que P53 (Vikhanskaya et al. 2007), des récepteurs de mort (Adams et al. 2005; Pérez-Chacón et al. 2012; Rozenfeld-Granot et al. 2001), la dérégulation de l'expression d'inhibiteur de l'apoptose (IAP) ou de l'activité des caspases. La surexpression des IAP a été identifiée dans de nombreux cancers, comme dans les tumeurs pancréatiques (Lopes et al. 2007), le mélanome (Vucic et al. 2000), ou le gliome (Z. Chen et al. 1999).

Par ailleurs, ainsi que nous l'avons décrit précédemment, les membres de la famille BCL-2 sont des acteurs essentiels de la régulation de l'apoptose. Un déséquilibre de la balance de l'expression des membres pro- et anti-apoptotiques conduit au développement de cancers, non pas en promouvant la prolifération mais en favorisant la survie cellulaire.

Chez l'Homme, BCL-2 est surexprimé suite à sa translocation t(14 ;18) dans environ 90% des lymphomes folliculaires à cellules B (Tsujiimoto et al. 1984). BCL-2 est également amplifié dans les leucémies lymphocytiques chroniques (Hanada et al. 1993), les tumeurs pulmonaires à petites cellules (Ikegaki et al. 1994), le carcinome du sein (Rochaix et al. 1999) et le glioblastome (Strik et al. 1999). MCL1 et BCL-XL, sont amplifiés dans diverses tumeurs, telles que les cancers des poumons, du sein, le gliome, le mélanome, le myélome multiple (Braun et al. 2013; Weyhenmeyer et al. 2012) et le médulloblastome comme le montrent des analyses des altérations du nombre de copies (SCNA) (Beroukhim et al. 2010). Dans le glioblastome, STAT5 et le récepteur à l'EGF, fréquemment altérés pourraient coopérer au

niveau du noyau pour induire l'expression de BCL-XL (Latha et al. 2013). Par ailleurs des études ont mis en évidence que la surexpression de BCL-XL dans le glioblastome et le mélanome de même que BCL2 dans le cancer du sein régulent la voie NFκB et, de fait contribuent respectivement à l'angiogenèse (Gabellini et al. 2008; Giorgini et al. 2007) et aux processus invasifs (Ricca et al. 2000).

Concernant les protéines pro-apoptotiques, la délétion bi-allélique de la protéine BIM est trouvée dans environ 17% des lymphomes à cellules B (Tagawa et al. 2005). Dans le glioblastome une expression réduite de plusieurs protéines BCL-2 à domaine BH3 seul est associée à une survie globale à 5 ans faible. Bien que l'expression individuelle de chaque membre de la famille ne soit pas un marqueur pronostic, la quantification du niveau d'expression de l'ensemble des protéines à domaine BH3 seul peut être considérée comme un biomarqueur prédictif de la survie des patients (Cartron et al. 2012).

Les défauts des processus apoptotiques semblent s'accroître au cours de l'évolution de la tumeur. Il est observé, par exemple une augmentation de l'expression de BCL-2 et une diminution de celle de BAX lors de la dissémination métastatique du cancer du colon (L. Oliver et al. 2002). En plus de leur rôle dans la carcinogenèse, le taux élevé des protéines anti-apoptotiques de la famille BCL2 est corrélé à la chimiorésistance et la radiorésistance. Au vue de ces activités, l'utilisation d'inhibiteurs de cette famille constituerait une approche thérapeutique potentielle contre les tumeurs de mauvais pronostic, résistantes aux thérapies.

4.4. Ciblage des protéines anti-apoptotiques BCL-2 en thérapeutique

La résistance à l'apoptose dans les cancers est souvent responsable de la résistance aux traitements. La grande majorité des drogues anticancéreuses utilisées agissent en activant la voie intrinsèque de l'apoptose des cellules tumorales. Pour survivre ces cellules acquièrent des anomalies leur permettant de résister à l'apoptose créant une dépendance à ces molécules dites de « survie ». Comme présenté précédemment, l'un des moyens qu'elles utilisent est la surexpression des protéines anti-apoptotiques de la famille BCL-2 (Juin et al. 2013; Weyhenmeyer et al. 2012). Cibler celles-ci semble donc être une stratégie intéressante permettant d'altérer spécifiquement et efficacement un mécanisme de survie des cellules cancéreuses (Ni Chonghaile et Letai 2008). Plusieurs approches ont été développées et visent à :

- Induire l'apoptose des cellules cancéreuses en surexprimant ou en activant les protéines pro-apoptotiques effectrices, telles que BAX (Gavathiotis et al. 2012).
- Diminuer l'expression des protéines anti-apoptotique en utilisant des oligonucléotides anti-sens (Oblimersen) qui inhibent la traduction de leur ARN messager (O'Brien et al. 2009).
- Inhiber l'activité des membres anti-apoptotiques en utilisant des molécules mimétiques des domaines BH3 des membres pro-apoptotiques. Les molécules mimétiques entrent ainsi en compétition avec les membres pro-apoptotiques (BAX, BAK, les activateurs à domaine BH3 seulement) au niveau de la poche hydrophobe des protéines anti-apoptotiques de la famille BCL2. De ce fait, les protéines BAX et BAK ne sont plus inhibées. La grande majorité de ces molécules inhibe plusieurs protéines anti-apoptotiques (Tableau 2), et s'avère efficaces en clinique. Pour citer quelques exemples, l'ABT-737 inhibe BCL2, BCL-XL et BCL-W (van Delft et al. 2006; Oltersdorf et al. 2005) ; le TW37, un dérivé du gossypol inhibe BCL-2, BCL-XL et MCL1. Utilisé comme simple agent, le TW37 réduit considérablement la croissance de différents types de cellules tumorales, par exemple du cancer du sein, de la prostate, du pancréas ou de lymphomes (Z. Wang et al. 2008). En dehors de son effet pro-apoptotique, il a été montré que le TW37 affecte également l'angiogénèse, essentielle au développement de la tumeur, et inhibe indirectement l'expression de facteurs impliqués dans le cycle cellulaire et l'invasion (Ashimori et al. 2009; Z. Wang et al. 2008).

Utilisées seules ces molécules peuvent se révéler d'une efficacité insuffisante aux doses tolérées par l'organisme. Elles pourraient néanmoins être utilisées en combinaison avec d'autres traitements plus classiques. En effet en leur associant des traitements conventionnels, ces drogues se sont révélées chimio-sensibilisantes comme par exemple dans les leucémies chroniques myéloïdes (O'Brien et al. 2009; Pierceall et al. 2014) ou dans les lymphomes à cellules B. En effet le TW37 sensibilise des cellules lymphoblastiques pourtant chimiorésistantes aux traitements classiques *in vitro*. *In vivo* l'association du TW37 et de la chimiothérapie classique induit une régression efficace de xénogreffes de cellules lymphoblastiques (Mohammad et al. 2007).

Les données de la littérature suggèrent un rôle crucial de l'altération des processus apoptotiques, et notamment une dérégulation de l'expression des protéines de la famille BCL-2 dans la carcinogénèse et la résistance aux traitements. Les stratégies visant à activer

l'apoptose utilisées seules ou en combinaison semblent efficaces dans différents types de tumeurs. Les essais cliniques en cours permettront dans les années à venir de valider l'utilisation de ces drogues « pro-apoptotiques » dans le traitement du cancer.

Nom	Société/Institution	Stratégie	Cible	Phase de développement
Genasense (Obilimersen sodlum)	Genta Incorporated	Anti-sens	BCL2	Phase III (leucémie lymphoïde chronique, mélanome)
(-)-Gossypol	Ascenta therapeutics	mimetic BH3	MCL1 / BCL2 / BCL-XL	Phase I/II (leucémie lymphoïde chronique);
Apogossypolone	Université du Michigan	dérivé Gossypol	BCL2 / BCL-XL / MCL1	préclinique
ABT 737/ ABT-263	Abbott Laboratories	mimetic BH3	BCL2 / BCL-XL / BCL-W	Phase I/II (leucémie lymphoïde chronique, cancer des poumons)
Obatoclax	GeminX	petite molécule	MCL1 / BCL-W / BCL2 / BCL-XL	Phase I/II (leucémie lymphoïde chronique, cancer du sein)
TW37	Université du Michigan	petite molécule	MCL1 / BCL2 / BCL-XL	préclinique
SAHBa	Aileron	peptide	BCL-XL / BCL2 / BAX	préclinique
WEHI539	Walter and Eliza Hall Institute of Medical Research	mimetic BH3	BCL-XL	découverte
Sabutoclax (ONT-701)	Oncocyteon Inc	petite molécule	MCL1 / BCL2 / BCL-XL / BFL1/A1	préclinique

TABLEAU 2 : LES INHIBITEURS DES PROTEINES DE LA FAMILLE BCL-2

Cette liste d'inhibiteurs n'est pas exhaustive

RESULTATS

1. Implication de la phosphorylation des MAF par GSK3 dans la carcinogénèse du myélome multiple

1.1. Contexte et objectifs du travail

Le myélome multiple (MM) est une hémopathie maligne due à la prolifération anormale de plasmocytes, des cellules B différenciées, de la moelle osseuse. Les MM peuvent être subdivisés en différents sous-groupes, présentant des caractéristiques moléculaires et cliniques distinctes (Fonseca et al. 2009; Zhan et al. 2002). L'un des sous-types se caractérise par des translocations t(14 ;16), t(14 ;20) et t(8 ;14), entraînant la surexpression de différents gènes de la famille des facteurs de transcription MAF (Boersma-Vreugdenhil et al. 2004; Chng et al. 2007; Fonseca et al. 2009; Inagaki et al. 2013; Kuehl et Bergsagel 2002). La surexpression des gènes MAF est associée à des tumeurs de mauvais pronostic (P Leif Bergsagel et al. 2013; Inagaki et al. 2013; Rajkumar et al. 2013). Il a été montré que les protéines MAF ont un rôle causatif dans la carcinogénèse du MM (Hurt et al. 2004; Morito et al. 2006; van Stralen et al. 2009; Vicente-Dueñas et al. 2012) en régulant, entre autre, l'expression des gènes cyclinD2, integrin β 7, ARK5 (A. Suzuki et al. 2005) et DEPTOR (Peterson et al. 2009). Les mécanismes par lesquels l'activité oncogénique des protéines MAF est régulée dans les MM ne sont pas identifiés.

Le laboratoire a montré que l'activité d'un des membres de la famille MAF, MAFA est régulée par phosphorylation (Benkhelifa et al. 2001; Rocques et al. 2007; Sii-Felice et al. 2005). En effet la phosphorylation de la sérine 65 par une primo-kinase entraîne une phosphorylation en cascade d'autres résidus situés en amont (S61, T57, T53, S49) par la protéine kinase GSK3 (Rocques et al. 2007). Ces phosphorylations augmentent d'une part l'activité transactivatrice de MAFA grâce au recrutement de co-activateurs et d'autre part conduisent à son ubiquitination suivie de sa dégradation par le protéasome. D'un point de vue fonctionnel, cette régulation par phosphorylation est essentielle à la transcription de certains gènes cibles et à l'activité transformante de MAFA, comme cela a été démontré dans des cultures de fibroblastes primaires (Rocques et al. 2007).

L'analyse des séquences primaires des grands membres de la famille MAF a permis de mettre en évidence que les résidus sérine (65, 49) et thréonine (57 et 53) sont conservés chez les

grands membres MAFA, c-MAF (S54, T58, T62, T66) et MAFB (S54, T58, T62, T66). Concernant NRL, seuls les résidus S65, S61 et T57 sont conservés et le résidu thréonine 53 est quant à lui converti en sérine (voire Figure 6).

Les données suivantes sont en faveur d'une régulation par phosphorylation de l'activité des protéines MAF dans le MM

- La surexpression de c-MAF et MAFB dans un sous-groupe de MM (Hurt et al. 2004; Vicente-Dueñas et al. 2012; Zhan et al. 2006)
- Le rôle oncogénique établi de c-MAF et MAFB dans le MM (Hurt et al. 2004; Morito et al. 2006; van Stralen et al. 2009)
- La conservation des sites de phosphorylation par GSK3 chez MAFA, c-MAF et MAFB (Eychène, Rocques, et Pouponnot 2008)

L'objectif de ce travail auquel j'ai participé en soutien était de déterminer, d'une part, si les facteurs de transcription c-MAF et MAFB sont phosphorylés dans le MM, et d'autre part, si leur activité oncogénique est régulée par phosphorylation par la kinase GSK3 dans le MM mais également d'établir si GSK3 peut constituer une nouvelle cible thérapeutique de ces MM résistants.

1.2. Régulation des protéines MAF par phosphorylation induite par GSK3 et ses conséquences fonctionnelles dans le myélome multiple

L'utilisation de différents outils, incluant les mutants de phosphorylation de c-MAF et MAFB, des inhibiteurs de GSK3 et des anticorps reconnaissant spécifiquement la forme phosphorylée (résidu T53-57) des protéines MAF, nous a permis de montrer dans un premier temps que GSK3 phosphoryle effectivement c-MAF et MAFB sur les résidus S54, T58, T62, T66 lorsqu'elles sont surexprimées dans une lignée cellulaire de rein embryonnaire, les 293T. Les formes mutantes de c-MAF et MAFB, pour lesquelles ces quatre résidus sérine/thréonine sont remplacés par des résidus alanine non phosphorylables, ne sont pas affectées par un traitement avec les inhibiteurs de GSK3. Dans le MM, ce travail met en évidence que c-MAF et MAFB sont bien exprimées dans différentes lignées cellulaires humaines de MM et qu'elles sont phosphorylées par GSK3.

Dans un second temps, nous nous sommes intéressés aux conséquences fonctionnelles de ces phosphorylations dans le MM. Comme il a été décrit précédemment, la phosphorylation de MAFA par GSK3 conduit à sa dégradation par le protéasome et paradoxalement favorise l'expression de certains gènes cibles. Ce travail établit que la phosphorylation par GSK3 induit également la dégradation de MAFB et c-MAF dans le MM. En effet, l'inhibition de GSK3 conduit à une diminution de leur phosphorylation, couplée à une stabilisation de ces deux protéines MAF. L'expression de certains gènes cibles des MAF, telle que celle du gène DEPTOR, est régulée par la phosphorylation des MAF par GSK3, suggérant ainsi que la phosphorylation de c-MAF et MAFB serait essentielle à leur activité oncogénique dans ce type de tumeur. En accord avec cette observation, l'inhibition de GSK3 dans des lignées cellulaires de MM qui expriment c-MAF ou MAFB diminue la prolifération et la croissance en absence d'ancrage. A l'inverse, les lignées cellulaires de MM n'exprimant ni c-MAF, ni MAFB sont insensibles à ces mêmes inhibiteurs. L'ensemble de ce travail suggère que l'activité oncogénique de c-MAF et MAFB est régulée à travers des mécanismes de phosphorylation par la protéine kinase GSK3 dans le MM. Le traitement des cellules de MM au Bortézomib, un inhibiteur du protéasome utilisé en thérapie, induit une stabilisation des formes phosphorylées de c-MAF et MAFB qui ne peuvent plus être dégradées par le protéasome. Puisque l'expression des MAF est associée à des MM résistants, notre travail suggère que le mécanisme de résistance au bortézomib serait dû à la stabilisation des formes phosphorylées des protéines MAF qui seraient les formes actives dans les processus oncogéniques. Notre étude suggère que l'inhibition de GSK3 par le chlorure de lithium, déjà utilisé chez l'Homme dans le traitement de troubles de l'humeur, pourrait potentiellement constituer une nouvelle stratégie thérapeutique de certains MM de mauvais pronostic, caractérisés par une surexpression des protéines MAF.

L'ensemble de ce travail fait l'objet d'une publication dans Blood Cancer Journal en 2014.

N.Herath, N.Rocques, **A.Garancher**, A.Eychène, C.Pouponnot. (2014) GSK3-mediated MAF phosphorylation in multiple myeloma as a potential therapeutic target. BCJ, 4, e175

ARTICLE 1

GSK3-mediated MAF phosphorylation in multiple myeloma as a potential therapeutic target

N.Herath, N.Rocques, **A.Garancher**, A.Eychène and C.Pouponnot

Blood Cancer Journal, Janvier 2014

ORIGINAL ARTICLE

GSK3-mediated MAF phosphorylation in multiple myeloma as a potential therapeutic target

NI Herath^{1,2,3,4}, N Rocques^{1,2,3,4}, A Garancher^{1,2,3,4}, A Eychène^{1,2,3,4} and C Pouponnot^{1,2,3,4}

Multiple myeloma (MM) is an incurable haematological malignancy characterised by the proliferation of mature antibody-secreting plasma B cells in the bone marrow. MM can arise from initiating translocations, of which the musculoaponeurotic fibrosarcoma (MAF) family is implicated in ~5%. MMs bearing *Maf* translocations are of poor prognosis. These translocations are associated with elevated *Maf* expression, including *c-MAF*, *MAFB* and *MAFA*, and with t(14;16) and t(14;20) translocations, involving *c-MAF* and *MAFB*, respectively. *c-MAF* is also overexpressed in MM through MEK/ERK activation, bringing the number of MMs driven by the deregulation of a *Maf* gene close to 50%. Here we demonstrate that *MAFB* and *c-MAF* are phosphorylated by the Ser/Thr kinase GSK3 in human MM cell lines. We show that LiCl-induced GSK3 inhibition targets these phosphorylations and specifically decreases proliferation and colony formation of *Maf*-expressing MM cell lines. Interestingly, bortezomib induced stabilisation of *Maf* phosphorylation, an observation that could explain, at least partially, the low efficacy of bortezomib for patients carrying *Maf* translocations. Thus, GSK3 inhibition could represent a new therapeutic approach for these patients.

Blood Cancer Journal (2014) 4, e175; doi:10.1038/bcj.2013.67; published online 17 January 2013

Keywords: multiple myeloma; *MAFB*; *MAFA*; *c-MAF*; GSK3; lithium

INTRODUCTION

Multiple myeloma (MM) is an incurable B-cell neoplasm of the bone marrow with a complex array of clinical manifestations.^{1–5} MM is further divided into seven disease subtypes based on molecular heterogeneity.^{6,7} Of these, one subtype corresponds to the recurrent translocations t(14;16) and t(14;20) involving different *musculoaponeurotic fibrosarcoma (Maf)* genes juxtaposed to immunoglobulin heavy chain enhancer elements, leading to their aberrant overexpression. Although still debated due to its relatively low prevalence, this group was shown to be associated with poor overall survival in MM.^{4,5,8–12}

Maf oncoproteins are basic leucine zipper transcription factors belonging to the AP-1 super family.¹³ The *Maf* family is composed of seven members that can be classified into two subfamilies, the large and small *Maf* genes. The large *Maf* members, *MAFA*, *MAFB*, *c-MAF* and *NRL*, differ from the small *Maf* members (*MAFF*, *MAFG* and *MAFK*) by the presence of a transactivation domain in their amino terminus.¹³ We and others demonstrated that large *Maf* proteins display strong transforming activity in chicken embryo fibroblasts, with *MAFA* being the most potent oncoprotein.^{14–16} We showed that *MAFA*-transforming activity in chicken embryo fibroblasts requires its phosphorylation by GSK3.¹⁷ Indeed, *MafA* is sequentially phosphorylated by GSK3 on residues S61, T57, T53 and S49.^{17,18} At the molecular level, these phosphorylations coupled two antagonistic processes. GSK3-mediated *MAFA* phosphorylation increased its transactivation activity but also induced its degradation.¹⁷

Approximately 5% of MMs bear *Maf* translocations that are associated with elevated *Maf* expression including *c-MAF*, *MAFB* and *MAFA*.^{7,19–21} The t(14;16) and t(14;20) translocations involving *c-MAF* and *MAFB*, respectively, are much more prevalent, with less

than 0.5% of MMs displaying *MAFA* translocations.^{1,4,5,7,13} In ~50% of MM patient samples lacking *Maf* translocations, *c-MAF* expression was observed at levels above those in normal plasma cells.^{22,23} *Maf* overexpression has a causative role in MM²² by regulating cyclin D2, integrin β 7, CCR1, ARK5 and DEPTOR expression, all of which have an important role in the pathogenesis of MM.^{22,24–27} These findings have been recently validated in a transgenic model, which develops B-cell lymphomas with features resembling MM-like disease highlighting *Maf* proteins as potential therapeutic targets in MM.²⁸ The latest advances in MM treatment include combination of immunomodulatory agents with the proteasome inhibitor drug, bortezomib.^{5,10,29,30} However, bortezomib appears not to be beneficial for patients carrying a *Maf* translocation.^{5,8,29} Therefore, there is an urgent need to identify additional therapeutic agents for the treatment of these patients with a poor outcome.

In the present study, we demonstrate that *MAFB* and *c-MAF*, the most frequently deregulated *Maf* in MM, are phosphorylated by GSK3, which mediates their degradation. Pharmacological inhibition of GSK3 targets these phosphorylations and leads to the decrease of MM cell proliferation and colony formation. This study provides the basis for further exploring GSK3 inhibition by lithium chloride (LiCl) in *Maf*-driven MMs in a clinical setting.

MATERIALS AND METHODS

Plasmid construction

Human *MAFB* and *c-MAF* wild type (WT) and mutated (4A) cDNAs were introduced in the pcDNA3 vector into the BamHI/EcoRI and HindIII/EcoRI restriction sites³¹ using PCR strategies.

¹Institut Curie, Centre de recherche, Laboratoire 110, Centre Universitaire, Orsay, France; ²INSERM U1021, Orsay, France; ³CNRS UMR 3347, Orsay, France and ⁴Université Paris Sud-11, Orsay, France. Correspondence: Dr C Pouponnot, Institut Curie U1021-UMR3347, Centre de recherche, Laboratoire 110, Centre Universitaire, Orsay 901405, France. E-mail: celio.pouponnot@curie.fr

Received 31 July 2013; revised 22 October 2013; accepted 30 October 2013

Cell culture and transfection

Human MM cell lines (HMCLs) RPMI8226 (RPMI), H929 (ATCC), JJN3, KMS12PE (KMS12), LP-1, L363, OPM2 (DSMZ), KMS28BM, KMS28PE and KMM1 (Japanese health sciences foundation) were cultured in RPMI1640 medium supplemented with FBS. KMS12 cells were cultured in RPMI1640–20% FBS and JJN3 in 40% DMEM, 40% IMDM and 20% FBS. For transfection, HEK293T cells were cultured in DMEM medium supplemented with 10% FBS and transfected by calcium phosphate method.

In vitro proliferation assays

Proliferation was assessed under serum-starving conditions (0.2% FBS), in the presence of the GSK3 inhibitor LiCl (Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France). Cells were treated on day 1 with 10 mM LiCl followed by daily treatment with 2.5 mM LiCl. Cells were seeded in duplicate at a density of 2×10^5 cells per 60-mm tissue culture dish and cultured for 7 days. Live cell counts were performed on days 1, 2, 3, 5 and 7.

Half-life studies, MG132, bortezomib treatment and western blotting

Total cell extracts were prepared in TNTSE lysis buffer (140 mM NaCl, 20 mM Tris pH 8, 2 mM EDTA, NP40, 1% Triton, 0.2% SDS, 20 µg/ml aprotinin, 1 mM AEBSF, 10 mM NaF, 1 mM DTT, 25 mM β-glycerophosphate and 1 mM orthovanadate). Nuclear protein extracts were prepared according to manufacturer's guidelines (Thermo Scientific, Courtaboeuf, France). Cells were treated with 20 mM LiCl (Sigma) and the following pharmacological inhibitors: 10 µM SB216763 (Sigma), 10 µM MG132 (Sigma) and 100 nM Bortezomib (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA). For bortezomib and MG132 treatment, cells were treated or not with LiCl for 1 h followed by MG132 or bortezomib treatment for 3 h. For half-life studies, cells were treated with 20 µg/ml cycloheximide (Sigma) for 30 min, 1, 2, 4 and 6 h time points in the presence or absence of LiCl.

Protein extracts were subjected to SDS-PAGE, transferred to Immobilon-P membranes (Millipore, Molsheim, France) and probed with anti-MafA (Abcam, Paris, France, 1/2000), anti-MAFB (Santa Cruz, Heidelberg, Germany, sc-10022 p20, 1/2000), anti-c-MAF (Santa Cruz, M153, 1/2000), anti-SAM68 (Santa Cruz, 1/5000), anti-β-actin (Sigma, 1/50000) and rabbit polyclonal T53-T57 phospho-specific (Rocques *et al.*,¹⁷ 1/2000) antibodies. After three washes in PBST buffer, membranes were incubated with the corresponding secondary antibody. Membranes were processed using chemiluminescence. Band intensities were measured using the G:box (Syngene, Saint Quentin en Yvelines, France) and normalised to β-actin.

Colony formation assay (Soft agar cell culture)

A mixture of 2 ml of pre-warmed (37 °C) RPMI1640 medium supplemented with 10% FBS and 2 ml pre-warmed (42 °C) 0.66% Bacto Agar Select/plate (Sigma) (0.33% final agar) was mixed with a 2×10^5 cell suspension and seeded over a 0.66% agar/full medium pre-layer (7 ml) in a 60-mm dish. The cells were allowed to grow in a humidified 37 °C incubator with 5% CO₂ for 3–4 weeks. Colony formation assays were assessed in the presence or absence of 5 mM LiCl, 10 µM GSK3 inhibitor VIII or 5 µM SB216763 (Sigma). Plates were scanned and the colony numbers were quantified using the ImageJ software.

RNA preparation and quantitative RT-PCR analysis

Total RNA extractions (Qiagen, Courtaboeuf Cedex, France) and reverse transcription (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) were performed according to manufacturer's recommendations. Quantitative real-time PCR (qPCR) analyses were performed using the SYBR Green master mix (Life Technologies, Courtaboeuf Cedex, France). Reactions were carried out in an iCycler Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, Marnes-la-Coquette, France) for 40 cycles (95 °C for 15 s/60 °C for 1 min) after an initial 10-min incubation at 95 °C. mRNA levels were normalised to levels of HPRT mRNA. All primer sequences are listed in Table 1.

Statistical analyses

Two-sided, equal variance *t*-tests were used for colony formation and qPCR assays. Data from proliferation curves between Li-treated and untreated cell lines were analysed using non-parametric Wilcoxon rank sum tests. All statistical analyses were performed using StatEL software (ad Science, Paris, France) and a *P*-value of <0.05 was considered statistically significant.

Table 1. qPCR oligonucleotides

Gene	Forward primer 5'–3'	Reverse primer 5'–3'
<i>MAFB</i>	GCTTCACCAAGGACGAGGT	GCTGCGTCTTCTCATTCTCC
<i>C-MAF</i>	GTCAGCAAGGAGGAGGTGAT	CTCCAGGACGTGTCTCTGCT
<i>DEPTOR</i>	TTTGTGGTGCAGGAAAGTAA	CATTGCTTTGTGTCACTTCTGG
<i>HPRT</i>	CCAGTCAACAGGGGACATAAA	CCTGACCAAGGAAAGCAAAG

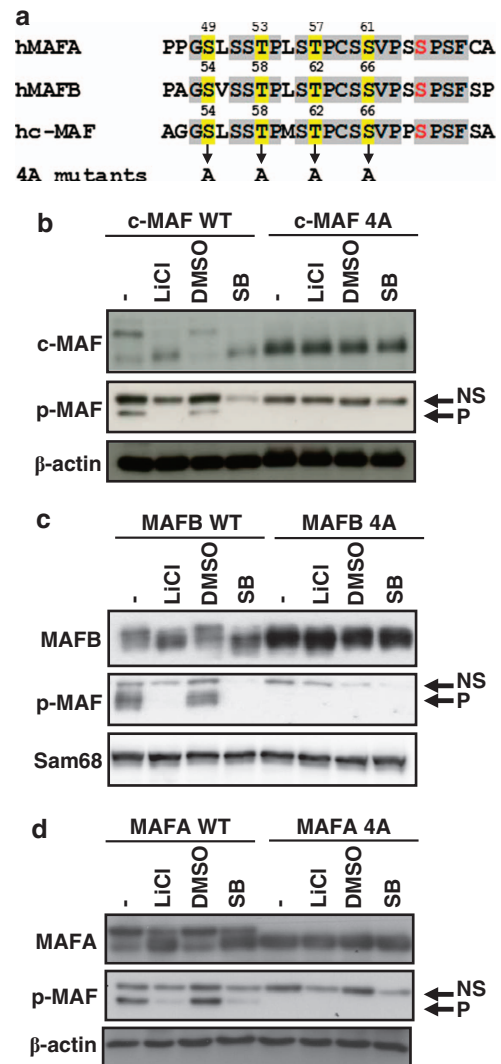


Figure 1. GSK3 phosphorylates MAFB and c-MAF proteins. (a) Amino acid sequence comparison of the large human Maf proteins (MAFA, MAFB and c-MAF). Putative GSK3 phosphorylation sites that are conserved among the different Maf proteins are highlighted in yellow. In the mutant unphosphorylatable form (4A), these putative GSK3 phosphorylation sites are mutated into alanine A. 293T cells were transfected using a pcDNA3-derived vector encoding the wild type (WT) and 4A mutants of human c-MAF (b), MAFB (c) and MAFA (d). GSK3 inhibitor treatment was done with 20 mM LiCl or 10 µM SB216763 (SB), on c-MAF, MAFB and MAFA, which demonstrates a comparable change for WT forms but had no effect on the 4A mutants. Total cell extracts were assessed by western blotting using the corresponding Maf antibodies, T53–57 phospho-specific MAFA (p-MAF) and β-actin antibodies. For MAFB (c), owing to a contaminating band in the close proximity of MAFB, nuclear extracts were used. Normalisation was carried out using an anti-Sam68 antibody. The p-MAF antibody cross-reacts with the phosphorylated forms of human c-MAF, MAFB and MAFA. NS, non-specific; P, phosphorylated forms.

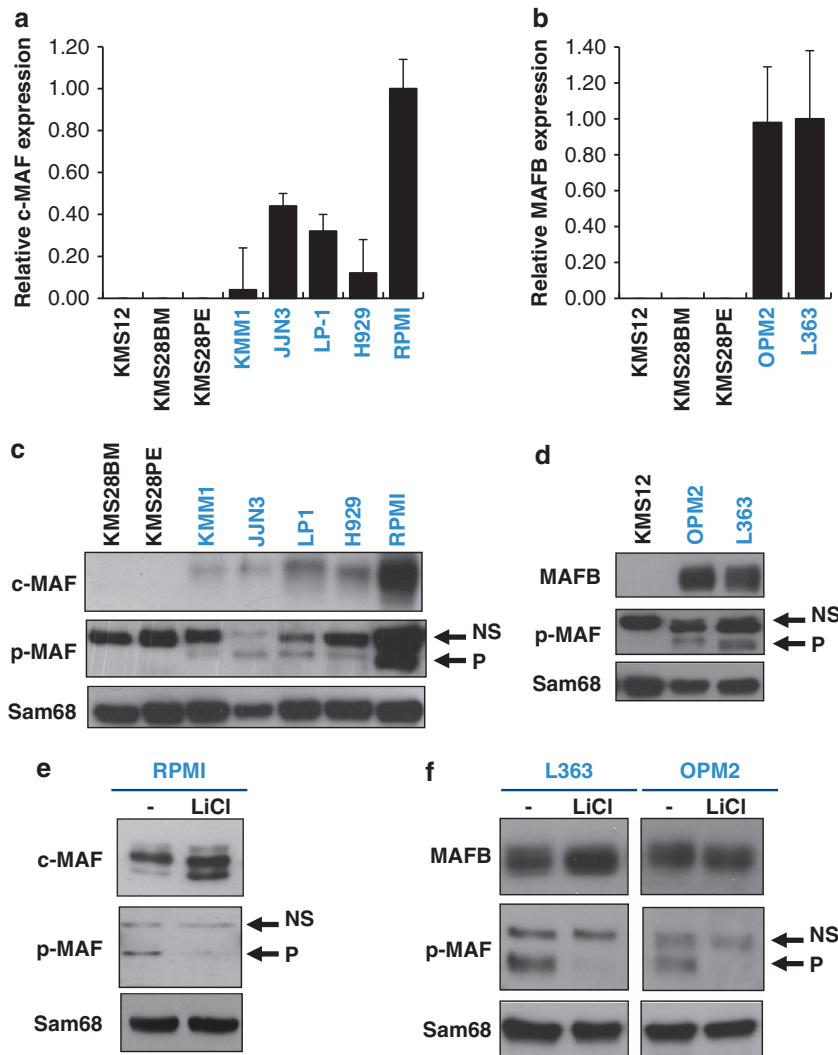


Figure 2. MAFB and c-MAF are phosphorylated by GSK3 in MM. Relative *c-MAF* (a) and *MAFB* (b) expression in MM cell lines (HMCLs) was determined by RT-qPCR. HMCLs nuclear extracts were analysed by western blot using *c-MAF* (c) and *MAFB* (d) antibodies, p-MAF and SAM68 antibodies. *c-MAF* (e) and *MAFB* (f) expressing cell lines were treated with LiCl as indicated. Anti-*c-MAF*, anti-*MAFB*, p-MAF and SAM68 western blots were carried out on nuclear extracts. NS, non-specific; P, phosphorylated forms.

RESULTS

GSK3 phosphorylates MAFB and c-MAF proteins

We previously demonstrated that MAFA is sequentially phosphorylated on residues Serine 61 (S61), Threonine 57, 53, 49 (T57, T53 and S49) by GSK3.¹⁷ These putative GSK3 phosphorylation sites are highly conserved amongst the large Maf proteins; MAFB and c-MAF (Figure 1a). In the current study, we focused on c-MAF and MAFB, the deregulation of which is the most prevalent in MM.

To investigate whether MAFB and c-MAF are phosphorylated by GSK3 on the corresponding residues, we generated constructs expressing the WT phosphorylatable forms and the mutant unphosphorylatable forms (4A) where the four putative GSK3 phosphorylation sites were mutated into alanine (Figure 1a). HEK293T cells were transfected with pcDNA3-derived vectors encoding the WT and 4A mutants of c-MAF, MAFB and MAFA as a control, and cell lysates were analysed by western blotting. Mutation of the four putative GSK3 phosphorylation sites profoundly altered the migration pattern of c-MAF (Figure 1b), MAFB (Figure 1c) and MAFA (Figure 1d). Treatment with LiCl or SB216763 (SB), two GSK3 inhibitors, led to a comparable change

for WT forms but had no effect on the 4A mutants. The migration patterns of the 4A mutants are similar to their corresponding WT forms on treatment with GSK3 inhibitors, suggesting that these residues are phosphorylated by GSK3. To confirm this phosphorylation, we made use of a previously described phospho-specific antibody that recognises T53 and T57 of chicken MAFA when dually phosphorylated (p-MAF Ab).¹⁷ This antibody also cross-reacts with the corresponding residues on MAFB (T58 and T62) and c-MAF (T58 and T62) when phosphorylated. Accordingly, the WT forms of human MAFA, MAFB and c-MAF but not the different 4A mutants were recognised by this antibody (Figure 1, middle panel). Treatment with GSK3 inhibitors prevented the detection of the WT proteins. Taken together, these results demonstrate that T58 and T62 of MAFB and c-MAF are phosphorylated by GSK3 in HEK293T. We next addressed whether c-MAF and MAFB are phosphorylated in MM.

GSK3 phosphorylates MAFB and c-MAF in MM

We undertook RT-qPCR to identify c-MAF- or MAFB-expressing HMCLs (Figure 2a). Western blot analysis was performed on

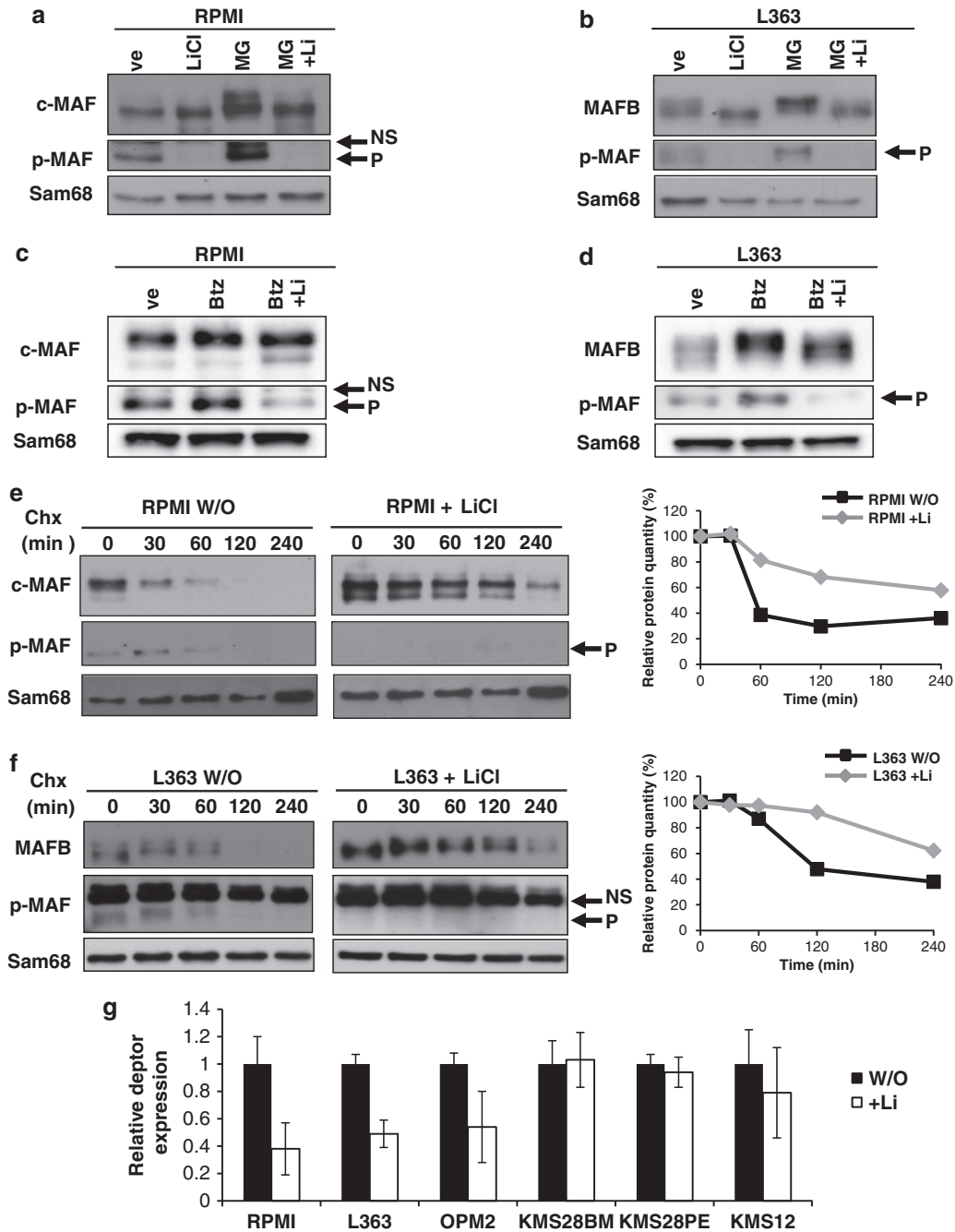


Figure 3. LiCl-mediated GSK3 inhibition leads to MAFB and c-MAF degradation and decreases *DEPTOR* expression. RPMI (a–c) and L363 (b–d) cells were treated or not with LiCl for 1 h and then with MG132 (MG) (a and b) or bortezomib (Btz) (c–d) for 3 h. Anti-c-MAF, MAFB, p-MAF and SAM68 western blots were carried out on nuclear extracts. RPMI (e) and L363 (f) cells were treated or not treated (w/o) with LiCl followed by treatment with 20 µg/ml cycloheximide (Chx) for the indicated time points. Nuclear extracts were analysed by western blots using c-MAF, MAFB, p-Maf and SAM68 antibodies. Band intensities were measured, normalised to SAM68 and plotted as a percentage of the initial band intensity (right panels). (g) The Relative *DEPTOR* expression in different HMCLs treated with LiCl (as indicated) was determined by RT-qPCR. Expression was normalised to HPRT. NS, non-specific; P, phosphorylated forms. *DEPTOR* expression was specifically decreased upon LiCl treatment in MAFB (L363 $P = 0.07$, OPM2 $P = NS$) and c-MAF-expressing cells (RPMI $P < 0.05$), but not in non-MAF-expressing cells ($P = NS$).

extracts prepared from different HMCLs, expressing MAFB (L363 and OPM2) and c-MAF (RPMI8226, H929, LP-1 and JJJ3 KMM1) and from cell lines with no endogenous expression of Maf proteins (KMS12PE (KMS12), KMS28PE and KMS28BM) as negative controls, using the p-Maf Ab (Figures 2c–f). MAFB and c-MAF phosphorylation on T58 and T62 was detected in each cell line expressing these transcription factors (Figures 2c and d). As all HMCLs express GSK3 α and GSK3 β (Supplementary Figure S2A and S2B), we assessed

whether these phosphorylations were mediated by GSK3. MM cell lines were treated with LiCl, a GSK3 inhibitor. The efficacy of this treatment was assessed through β -catenin accumulation, a known target of GSK3 (Supplementary Figure S2C). LiCl treatment led to the inhibition of MAFB and c-MAF phosphorylation (Figures 2e and f and Supplementary Figures S2D and S2E). This result demonstrates that Maf proteins are phosphorylated by GSK3 in HMCLs.

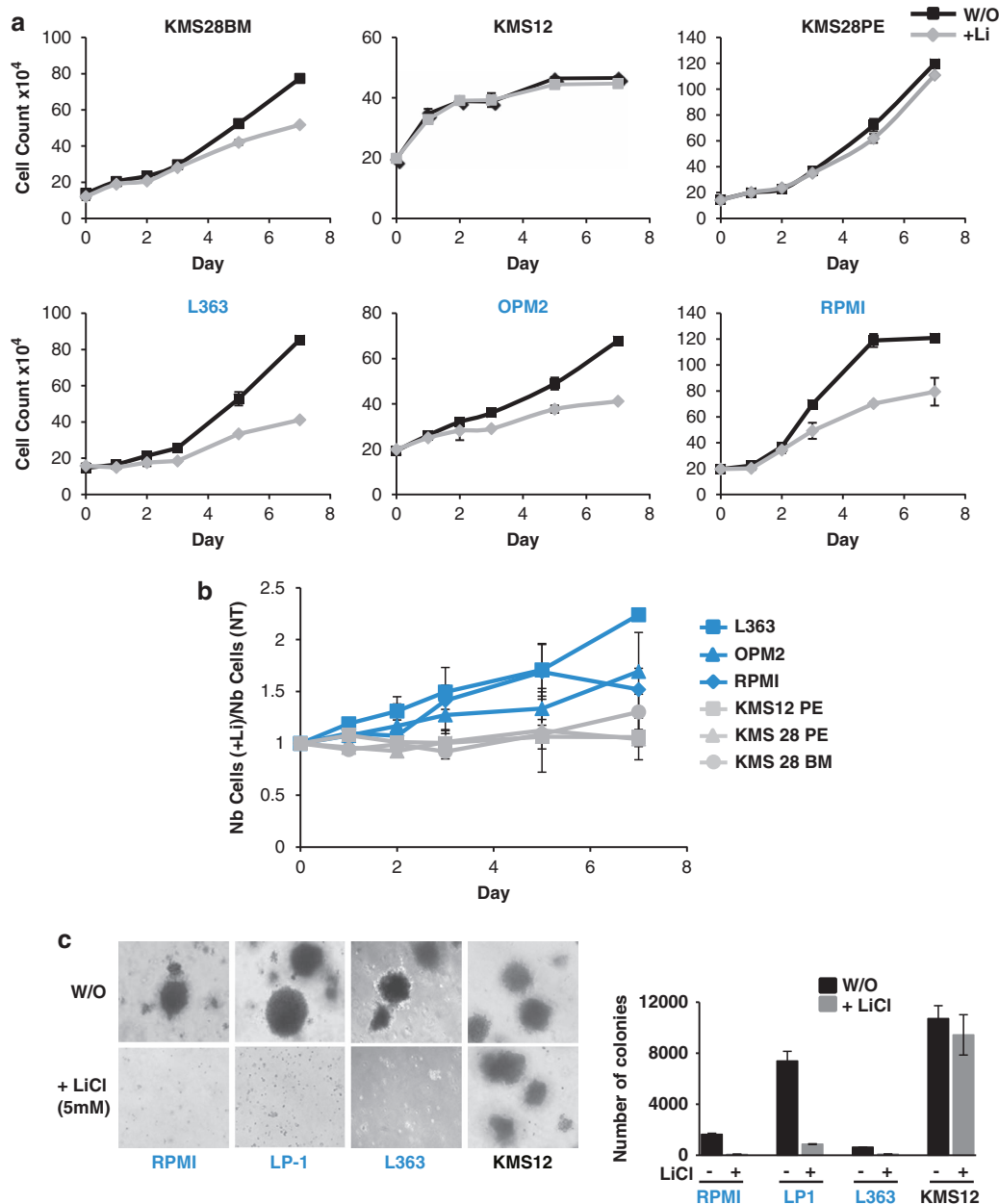


Figure 4. LiCl treatment decreases cell proliferation and colony formation in Maf-expressing MM cells. Maf-expressing cell lines (RPMI, LP-1, L363 and OPM2) are indicated in blue and non-expressing cell lines (KMS12, KMS28PE and KMS28BM) in black. (a) These cell lines were treated without (w/o) and with 10 mM LiCl. Proliferation assays were conducted and live cell counts were performed in triplicate, on days, 0, 1, 2, 3, 5 and 7. (b) To directly assess the LiCl sensitivity on the rate of HMCLs proliferation, the results obtained in a were graphed for each cell line as the number of cells in LiCl-treated culture relative to that of the non-treated condition. The average rate of proliferation of Maf-negative cell lines was significantly less affected by LiCl than c-MAF- or MAFB-expressing cell lines ($P < 0.05$). (c) Phase contrast images of soft agar assays without (w/o) and with 5 mM LiCl treatment. Plates were scanned, and the colony numbers were quantified using ImageJ and plotted for each cell line. Medium containing or not LiCl was renewed once a week for 3–4 weeks. LiCl significantly decreased colony formation in Maf-expressing cell lines; L363, LP-1 and RPMI ($P < 0.05$), it had no effect on Maf-negative cells (KMS12, $P = NS$).

GSK3-mediated phosphorylation induces MAFB and c-MAF degradation in MM

We next assessed whether these phosphorylations alter Maf stability in MM. Treatment with the proteasome inhibitors MG132 and bortezomib lead to the stabilisation of the slower migrating bands of both c-MAF and MAFB (Figures 3a–d, upper panel) that correspond to the phosphorylated forms. This result was confirmed using the p-Maf Ab (Figures 3a–d, middle panel). T58 and T62 phosphorylation of MAFB and c-MAF increased on MG132 and bortezomib treatment, whereas disappearing on LiCl

treatment, confirming that GSK3-mediated Maf phosphorylation leads to their degradation through the proteasome. To further support this conclusion, L363 (MAFB expressing) and RPMI (c-MAF expressing) cell lines were used for half-life studies (Figures 3e and f). Cycloheximide treatment demonstrated a shorter half-life for the phosphorylated forms of both c-MAF and MAFB and a much longer half-life in dephosphorylated forms induced by LiCl treatment. These results were confirmed on the WT and 4A forms of c-MAF and MAFB in 293T cells (Supplementary Figure S1). Taken together, these results show that GSK3-mediated MAFB and

c-MAF phosphorylation leads to their degradation through a proteasome-dependent pathway in MM.

The expression of the MAF target gene *DEPTOR* is sensitive to LiCl treatment

We investigated whether inhibition of GSK3 could lead to a modulation of Maf target gene expression in HMCLs. We examined the effect of GSK3 inhibition on LiCl treatment on the expression level of different Maf target genes. No changes were detected for *ITGB7* and *CCND2* expression (data not shown). In contrast, *DEPTOR* expression was specifically decreased on LiCl treatment in MAFB- and c-MAF-expressing cells, but not in non-Maf-expressing cells (Figure 3e). Therefore, phosphorylation of c-MAF and MAFB appears to be correlated with an induction of *DEPTOR* expression, although their stability is decreased.

LiCl treatment decreases cell proliferation and colony formation in Maf-expressing HMCLs

As LiCl was able to target Maf phosphorylation in MM, we next investigated whether Maf-expressing HMCLs were sensitive to this GSK3 inhibitor. We first assessed whether LiCl treatment could affect cell proliferation. For this purpose, we performed growth curve analyses under low serum conditions on different HMCLs expressing (RPMI, L363 and OPM2) or not expressing (KMS12, KMS28BM and KMS28PE) Maf proteins in the presence or absence of LiCl. As shown in Figure 4, a significant correlation was observed between Maf-expressing cells and sensitivity to LiCl. Interestingly, the rate of proliferation of Maf-negative cell lines was significantly less affected by LiCl than c-MAF- or MAFB-expressing cell lines (Figures 4a and b). To gain further insight into the effect of LiCl on Maf-mediated transformation in MM, we tested the effect of LiCl on colony formation under semi-solid conditions (Figure 4c). We seeded L363, RPMI, LP-1 and KMS12 on semi-solid medium in the presence and absence of LiCl. Although LiCl significantly decreased colony formation in Maf-expressing cell lines, L363, LP-1 and RPMI, it had no effect on Maf-negative cell lines (KMS12). These results were confirmed using two structurally unrelated GSK3 inhibitors (GSK3 inhibitor VIII and SB216763) (Supplementary Figure S2 and S3). In conclusion, Maf-expressing HMCLs display sensitivity to LiCl.

DISCUSSION

Owing to its negative effect on β -catenin stability, GSK3 is usually thought to have an inhibitory role in tumorigenic processes. However, several studies reported a positive role for GSK3 in cancer.^{32–34} For example, it represents a potential therapeutic target in mixed-lineage leukaemia.^{35,36} Recently, it was also demonstrated to have a pro-survival function in MM by permitting the activation of the non-canonical NF κ B pathway.³⁷ In this study, we demonstrate that MAFB and c-MAF are phosphorylated by GSK3 on residues T62 and T58 in MM cell lines. At the biochemical level, our results are compatible with a model where phosphorylation of c-MAF and MAFB in MM may trigger two antagonist effects, namely their destabilisation and an increase of their transactivation ability at least for a subset of target genes, as previously demonstrated for MAFA in Chicken embryo fibroblasts.¹⁷ This raises the possibility that degradation could be required for Maf transactivation, as demonstrated for other transcription factors.³⁸ We show that these phosphorylations can be targeted by the GSK3 inhibitor, lithium, a therapeutic agent already approved for patients suffering from mood disorders.^{39,40} Importantly, proliferation and colony formation of Maf-expressing cells are particularly sensitive to LiCl-mediated GSK3 inhibition. Our results suggest that the maintenance of these phosphorylations is essential for MAFB- and c-MAF-transforming activity in MM. Interestingly, proteasome

inhibition by bortezomib leads to the stabilisation of Maf phosphorylation and overall Maf accumulation, an observation that could explain, at least partially, the low efficacy of bortezomib for patients carrying *Maf* translocations. In conclusion, aside from its role in non-canonical NF κ B signalling, GSK3 also controls Maf phosphorylation, which could constitute a therapeutic target in MM. Our study suggests that patients bearing a Maf-driven MM could particularly benefit from therapies targeting GSK3.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Christophe Alberti and Elodie Belloir for technical assistance. We are also grateful to Drs Dominique Dusmenil, Isabelle Dusanter and Evelyne Lauret for the transfer of various technologies and helpful advice. This work was funded by the Fondation ARC (grant number #5089) and Ligue contre le cancer (grant numbers CV/CB/055-10 and NM/CP/M16649). NH received fellowships from Fondation ARC and Institut Curie.

REFERENCES

- Chng WJ, Glebov O, Bergsagel PL, Kuehl WM. Genetic events in the pathogenesis of multiple myeloma. *Best Pract Res Clin Haematol* 2007; **20**: 571–596.
- Hideshima T, Mitsiades C, Tonon G, Richardson PG, Anderson KC. Understanding multiple myeloma pathogenesis in the bone marrow to identify new therapeutic targets. *Nat Rev Cancer* 2007; **7**: 585–598.
- Kuehl WM, Bergsagel PL. Multiple myeloma: evolving genetic events and host interactions. *Nat Rev Cancer* 2002; **2**: 175–187.
- Morgan GJ, Walker BA, Davies FE. The genetic architecture of multiple myeloma. *Nat Rev Cancer* 2012; **12**: 335–348.
- Chesi M, Bergsagel PL. Many multiple myelomas: making more of the molecular mayhem. *Hematol Am Soc Hematol Educ Program* 2011; **2011**: 344–353.
- Zhan F, Huang Y, Colla S, Stewart JP, Hanamura I, Gupta S et al. The molecular classification of multiple myeloma. *Blood* 2006; **108**: 2020–2028.
- Fonseca R, Bergsagel PL, Drach J, Shaughnessy J, Gutierrez N, Stewart AK et al. International Myeloma Working Group molecular classification of multiple myeloma: spotlight review. *Leukemia* 2009; **23**: 2210–2221.
- Bergsagel PL, Mateos MV, Gutierrez NC, Rajkumar SV, San Miguel JF. Improving overall survival and overcoming adverse prognosis in the treatment of cytogenetically high-risk multiple myeloma. *Blood* 2013; **121**: 884–892.
- Munshi NC, Anderson KC, Bergsagel PL, Shaughnessy J, Palumbo A, Durie B et al. Consensus recommendations for risk stratification in multiple myeloma: report of the International Myeloma Workshop Consensus Panel 2. *Blood* 2011; **117**: 4696–4700.
- Rajkumar SV. Treatment of multiple myeloma. *Nat Rev Clin Oncol* 2011; **8**: 479–491.
- Rajkumar SV. Multiple myeloma: 2013 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol* 2013; **88**: 225–235.
- Avet-Loiseau H, Malard F, Campion L, Magrangeas F, Sebban C, Lioure B et al. Translocation t(14;16) and multiple myeloma: is it really an independent prognostic factor? *Blood* 2011; **117**: 2009–2011.
- Eychene A, Rocques N, Pouponnot C. A new MAFia in cancer. *Nat Rev Cancer* 2008; **8**: 683–693.
- Pouponnot C, Sii-Felice K, Hmitou I, Rocques N, Lecoin L, Druillennec S et al. Cell context reveals a dual role for Maf in oncogenesis. *Oncogene* 2006; **25**: 1299–1310.
- Kataoka K, Shioda S, Yoshitomo-Nakagawa K, Handa H, Nishizawa M. Maf and Jun nuclear oncoproteins share downstream target genes for inducing cell transformation. *J Biol Chem* 2001; **276**: 36849–36856.
- Nishizawa M, Kataoka K, Vogt PK. MafA has strong cell transforming ability but is a weak transactivator. *Oncogene* 2003; **22**: 7882–7890.
- Rocques N, Abou Zeid N, Sii-Felice K, Lecoin L, Felder-Schmittbuhl MP, Eychene A et al. GSK-3-mediated phosphorylation enhances Maf-transforming activity. *Mol Cell* 2007; **28**: 584–597.
- Han SI, Aramata S, Yasuda K, Kataoka K. MafA stability in pancreatic beta cells is regulated by glucose and is dependent on its constitutive phosphorylation at multiple sites by glycogen synthase kinase 3. *Mol Cell Biol* 2007; **27**: 6593–6605.
- Chesi M, Bergsagel PL, Shonukan OO, Martelli ML, Brents LA, Chen T et al. Frequent dysregulation of the c-maf proto-oncogene at 16q23 by translocation to an Ig locus in multiple myeloma. *Blood* 1998; **91**: 4457–4463.

- 20 Hanamura I, Iida S, Akano Y, Hayami Y, Kato M, Miura K *et al*. Ectopic expression of MAFB gene in human myeloma cells carrying (14;20)(q32;q11) chromosomal translocations. *Jpn J Cancer Res* 2001; **92**: 638–644.
- 21 Boersma-Vreugdenhil GR, Kuipers J, Van Stralen E, Peeters T, Michaux L, Hagemeyer A *et al*. The recurrent translocation t(14;20)(q32;q12) in multiple myeloma results in aberrant expression of MAFB: a molecular and genetic analysis of the chromosomal breakpoint. *Br J Haematol* 2004; **126**: 355–363.
- 22 Hurt EM, Wiestner A, Rosenwald A, Shaffer AL, Campo E, Grogan T *et al*. Overexpression of c-maf is a frequent oncogenic event in multiple myeloma that promotes proliferation and pathological interactions with bone marrow stroma. *Cancer Cell* 2004; **5**: 191–199.
- 23 Annunziata CM, Hernandez L, Davis RE, Zingone A, Lamy L, Lam LT *et al*. A mechanistic rationale for MEK inhibitor therapy in myeloma based on blockage of MAF oncogene expression. *Blood* 2011; **117**: 2396–2404.
- 24 Suzuki A, Iida S, Kato-Uranishi M, Tajima E, Zhan F, Hanamura I *et al*. ARK5 is transcriptionally regulated by the Large-MAF family and mediates IGF-1-induced cell invasion in multiple myeloma: ARK5 as a new molecular determinant of malignant multiple myeloma. *Oncogene* 2005; **24**: 6936–6944.
- 25 Morito N, Yoh K, Fujioka Y, Nakano T, Shimohata H, Hashimoto Y *et al*. Overexpression of c-Maf contributes to T-cell lymphoma in both mice and human. *Cancer Res* 2006; **66**: 812–819.
- 26 Peterson TR, Laplante M, Thoreen CC, Sancak Y, Kang SA, Kuehl WM *et al*. DEPTOR is an mTOR inhibitor frequently overexpressed in multiple myeloma cells and required for their survival. *Cell* 2009; **137**: 873–886.
- 27 van Stralen E, van de Wetering M, Agnelli L, Neri A, Clevers HC, Bast BJ. Identification of primary MAFB target genes in multiple myeloma. *Exp Hematol* 2009; **37**: 78–86.
- 28 Morito N, Yoh K, Maeda A, Nakano T, Fujita A, Kusakabe M *et al*. A novel transgenic mouse model of the human multiple myeloma chromosomal translocation t(14;16)(q32;q23). *Cancer Res* 2011; **71**: 339–348.
- 29 Kuehl WM, Bergsagel PL. Molecular pathogenesis of multiple myeloma and its premalignant precursor. *J Clin Invest* 2012; **122**: 3456–3463.
- 30 Mahindra A, Laubach J, Raju N, Munshi N, Richardson PG, Anderson K. Latest advances and current challenges in the treatment of multiple myeloma. *Nat Rev Clin Oncol* 2012; **9**: 135–143.
- 31 Benkhalifa S, Provot S, Lecoq O, Pouponnot C, Calothy G, Felder-Schmittbuhl MP. mafA, a novel member of the maf proto-oncogene family, displays developmental regulation and mitogenic capacity in avian neuroretina cells. *Oncogene* 1998; **17**: 247–254.
- 32 Patel S, Woodgett J. Glycogen synthase kinase-3 and cancer: good cop, bad cop? *Cancer Cell* 2008; **14**: 351–353.
- 33 Billadeau DD. Primers on molecular pathways. The glycogen synthase kinase-3beta. *Pancreatology* 2007; **7**: 398–402.
- 34 Ougolkov AV, Billadeau DD. Targeting GSK-3: a promising approach for cancer therapy? *Future Oncol* 2006; **2**: 91–100.
- 35 Wang Z, Smith KS, Murphy M, Piloto O, Somerville TC, Cleary ML. Glycogen synthase kinase 3 in MLL leukaemia maintenance and targeted therapy. *Nature* 2008; **455**: 1205–1209.
- 36 Wang Z, Iwasaki M, Ficara F, Lin C, Matheny C, Wong SH *et al*. GSK-3 promotes conditional association of CREB and its coactivators with MEIS1 to facilitate HOX-mediated transcription and oncogenesis. *Cancer Cell* 2010; **17**: 597–608.
- 37 Busino L, Millman SE, Scotto L, Kyrtasous CA, Basrur V, O'Connor O *et al*. Fbxw7alpha- and GSK3-mediated degradation of p100 is a pro-survival mechanism in multiple myeloma. *Nat Cell Biol* 2012; **14**: 375–385.
- 38 Geng F, Wenzel S, Tansey WP. Ubiquitin and proteasomes in transcription. *Annu Rev Biochem* 2012; **81**: 177–201.
- 39 Doble BW, Woodgett JR. GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. *J Cell Sci* 2003; **116**: 1175–1186.
- 40 Li X, Joje RS. Is glycogen synthase kinase-3 a central modulator in mood regulation? *Neuropsychopharmacology* 2010; **35**: 2143–2154.



This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 3.0 Unported License. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>

Supplementary Information accompanies this paper on Blood Cancer Journal website (<http://www.nature.com/bcj>)

2. Implication du facteur de transcription NRL dont l'expression est spécifique des photorécepteurs dans la carcinogenèse de médulloblastomes agressifs.

2.1. Contexte et objectifs du travail

Le médulloblastome (MB) est une tumeur pédiatrique hautement invasive du cervelet. Bien que les traitements classiques qui associent chirurgie, chimiothérapie et radiothérapie aient amélioré le taux de guérison, 30% des patients restent incurables et ne survivent pas. De plus, les survivants souffrent d'effets secondaires importants liés aux traitements utilisés. Des analyses transcriptomiques ont permis d'identifier 4 entités différentes (Northcott, Korshunov, et al. 2011; Michael D Taylor et al. 2012). Parmi celles-ci, le groupe 3 est le plus problématique d'un point de vue clinique car très métastatique, de très mauvais pronostic et résistant aux thérapies classiques et ciblées (Northcott, Jones, et al. 2012). Il se caractérise par une surexpression de MYC, par amplification dans certains cas. Cependant, cette surexpression ne suffit pas pour conduire au développement de MB de groupe 3 (D. Kawauchi et al. 2012; Pei et al. 2012) et les événements oncogéniques coopérant avec MYC n'ont pas encore été identifiés. Ces MB restent encore mal caractérisés d'un point de vue moléculaire et il n'en n'existe pas de modèles précliniques satisfaisants. Il est donc urgent de générer des modèles précliniques, d'identifier des biomarqueurs et les événements oncogéniques participant à la carcinogenèse de ces MB.

Le groupe 3 de MB montre une caractéristique très surprenante puisqu'il exprime un ensemble de gènes, dont l'expression est spécifique aux photorécepteurs, un type cellulaire de la rétine (Kool et al. 2008). Cette marque, identifiée depuis de nombreuses années, n'est pourtant pas encore expliquée. Elle est considérée comme une marque de différenciation aberrante ne participant pas au processus tumoral mais résultant de la plasticité des cellules cancéreuses. Au sein de ce programme d'expression génique spécifique des photorécepteurs (programme photorécepteur), le facteur de transcription NRL (Neural Retina leucine zipper), est normalement exprimé dans un sous-type particulier de photorécepteurs de la rétine, les bâtonnets dont il contrôle la différenciation (Mears et al. 2001; Anand Swaroop, Kim, et Forrest 2010). Il est également exprimé dans la glande pinéale, dont certains neurones présentent des caractéristiques communes avec les photorécepteurs. NRL appartient à la famille des protéines MAF, caractérisées par une dualité fonctionnelle. Alors que les protéines

MAF sont impliquées dans des mécanismes de différenciation terminale dans des conditions physiologiques, ce sont également des oncogènes bien établis (Eychène, Rocques, et Pouponnot 2008). L'activité oncogénique de NRL n'avait néanmoins jamais été évaluée.

Etant donné que les facteurs de transcription MAF agissent comme des oncoprotéines dans divers types cellulaires, différents de ceux où ils sont normalement exprimés et qu'ils jouent un rôle direct dans le développement de tumeurs chez l'Homme, nous avons émis l'hypothèse qu'au même titre que les autres membres de la famille, NRL, exercerait également une activité oncogénique dans le contexte du MB.

L'objectif de ce projet était de déterminer si l'expression de NRL est impliquée uniquement dans l'induction de la marque de différenciation « photorécepteur » du sous-type 3 ou, s'il participe activement à la carcinogenèse de ces MB. Cette étude contribuerait alors à la caractérisation et à la compréhension de la biologie d'un sous-type de MB encore mal défini, et permettrait ainsi d'expliquer qu'un programme de différenciation aberrant peut participer directement à la progression tumorale par l'intermédiaire d'un de ces acteurs clés. Enfin, ce travail constituerait la première démonstration du rôle oncogénique de NRL, en particulier dans le MB. L'identification de gènes cibles de NRL pourrait constituer des cibles thérapeutiques potentielles de MB agressifs.

2.2. Identification du rôle oncogénique de NRL dans le médulloblastome

L'approche gain de fonction de NRL par surexpression a montré que la surexpression stable de NRL dans deux lignées cellulaires de MB module différentes propriétés des cellules tumorales. D'une part, l'expression ectopique de NRL favorise la prolifération cellulaire en condition de carence en facteurs nutritifs, la croissance en absence d'ancrage et la formation de tumeurs, que ce soit par greffes sous-cutanées ou orthotopiques au niveau du cervelet. D'autre part, des expériences de vidéomicroscopie et de migration en chambre de Boyden contenant du matrigel indiquent que NRL favorise la migration et l'invasion des cellules de MB et pourrait suggérer que NRL puisse être impliquée dans les processus métastatiques. Ce facteur de transcription possède donc cette dualité fonctionnelle, au même titre que les autres membres de la famille MAF. Bien que NRL soit impliqué dans la différenciation terminale d'un type de photorécepteur, ce travail établit pour la première fois que le facteur de transcription spécifique des photorécepteurs NRL est un oncogène, en particulier dans le MB.

2.3. Etude du rôle oncogénique de NRL dans les médulloblastomes de groupe 3

L'activité oncogénique de NRL est à présent établie. Nous nous sommes alors attachés à comprendre les mécanismes par lesquels NRL agit dans les MB de groupe 3. Nous avons pour cela éteint l'expression de NRL en utilisant des shARN spécifiques. *In vitro*, l'extinction de NRL induit une mort massive par apoptose de lignées cellulaires de MB et de cultures primaires de MB humains de groupe 3. *In vivo*, l'extinction de NRL empêche la croissance tumorale de ces cellules par greffes sous-cutanées ou orthotopiques, au site de la tumeur primaire, le cervelet. Ces expériences démontrent que NRL est essentiel à la tumorigénèse de MB de groupe 3.

Nous avons ensuite cherché à savoir si NRL participe à la carcinogénèse de ce troisième sous-type de MB en induisant uniquement une partie du programme photorécepteur ou bien en régulant également l'expression d'autres gènes cibles. L'analyse de l'expression de gènes du programme photorécepteur dans nos différents modèles montre que l'expression de certains gènes est diminuée lorsque NRL est éteint. A l'inverse, la seule surexpression NRL n'est pas suffisante pour induire leur expression. Etant donné que NRL est capable de transformer des cellules de MB, lorsqu'il est exprimé ectopiquement, il semble que NRL exerce son activité oncogénique dans les MB de groupe 3 en régulant l'expression d'autres gènes. Des analyses de transcriptomes ont permis d'identifier des gènes dont l'expression est corrélée à celle de NRL dans les MB. Parmi eux se trouve le gène anti-apoptotique BCL-XL (BCL2L1). Son expression est corrélée à celle de NRL dans nos différents modèles par gain et perte de fonction. Des expériences d'immunoprécipitation de chromatine ont permis d'établir que BCL-XL est un gène cible de NRL.

Dans le but de déterminer si BCL-XL constitue une cible thérapeutique potentielle de ces MB agressifs, nous avons utilisé d'une part une approche par shARN dirigé spécifiquement contre BCL-XL et d'autre part un inhibiteur de la famille des protéines anti-apoptotiques BCL, le TW37. L'extinction de BCL-XL par shARN conduit à la mort des cellules de MB par apoptose. De plus, nous avons montré que différents modèles cellulaires issus de MB de groupe 3, comprenant des xéngreffes de MB humains, sont sensibles au TW37. *In vitro*, le traitement au TW37 induit une apoptose massive des cellules. *In vivo*, cet inhibiteur inhibe la croissance tumorale de cellules injectées au niveau du cervelet et induit également une régression de tumeurs intra-cérébelleuses préexistantes.

De façon intéressante, l'expression de NRL est associée à des MB qui surexpriment l'oncogène MYC. Bien qu'il soit un oncogène puissant, MYC régule également l'expression de gènes pro-apoptotiques. C'est pourquoi nous émettons l'hypothèse que NRL pourrait coopérer avec MYC dans les MB de groupe 3, en protégeant les cellules tumorales de l'apoptose, induite par MYC. Par ailleurs, les modèles murins de ce sous-type de MB sont basés sur la surexpression de MYC associée à la perte de TP53 dans des progéniteurs du cervelet (D. Kawauchi et al. 2012; Pei et al. 2012). L'expression seule de MYC ne suffit pas au développement d'un MB. La perte de TP53 compenserait donc l'action pro-apoptotique de MYC. Il serait intéressant d'associer l'expression de MYC et NRL dans les progéniteurs du cervelet. Malheureusement, cette approche pourrait se révéler inefficace puisque le promoteur du gène *bcl-xl* murin ne semble pas contenir de séquence MARE, nécessaire à sa régulation par le facteur de transcription de NRL.

En conclusion, le facteur de transcription NRL protège les MB de l'apoptose, en régulant l'expression du gène anti-apoptotique *BCL-XL*. Ce travail identifie un nouvel acteur clé d'un groupe de MB, encore mal caractérisé et propose que des thérapies ciblant la famille des anti-apoptotiques BCL pourraient constituer une alternative efficace aux traitements de ces MB pédiatriques résistants.

L'ensemble de ce travail fait l'objet d'un travail soumis pour publication.

A.Garancher, N.Rocques, M.Morabito, M.Larcher, L.Bihannic, W.Richer, C.Miquel, S.Dodier, N.Herath, F.Dupuy, C.Haberler, C.Walczak, N.El Tayara, A.Volk, S.Puget, O.Delattre, F.Doiz, O.Ayrault, A.Eychène, F.Bourdeaut, C.Pouponnot. Aggressive Medulloblastoma subverts the photoreceptor specific transcription factor NRL.

ARTICLE 2

Aggressive Medulloblastoma subverts the photoreceptor specific transcription factor NRL

A.Garancher, N.Rocques, M.Morabito, M.Larcher, L.Bihannic, W.Richer, C.Miquel, S.Dodier, N.Herath, F.Dupuy, C.Haberler, C.Walczak, N.El Tayara, A.Volk, S.Puget, O.Delattre, F.Doiz, O.Ayrault, A.Eychène, F.Bourdeaut and C.Pouponnot

Soumis

Aggressive Medulloblastoma subverts the photoreceptor specific transcription factor NRL

Alexandra Garancher^{1,2,3,4}, Nathalie Rocques^{1,2,3,4}, Morgane Morabito^{1,2,3,4}, Magalie Larcher^{1,2,3,4}, Laure Bihannic^{1,5,6}, Wilfrid Richer^{7,8}, Catherine Miquel^{10,15}, Sophie Dodier^{1,5,6}, Nirmitha I. Herath^{1,2,3,4}, Fanny Dupuy^{1,2,3,4,11}, Christine Haberler¹⁴, Christine Walczak^{1,12}, Nadine El Tayara^{1,12}, Andreas Volk^{1,12}, Stéphanie Puget^{13,15}, François Doz^{7,9,15}, Olivier Delattre^{7,8}, Olivier Ayrault^{1,5,6}, Alain Eychène^{1,2,3,4}, Franck Bourdeaut^{7,8,9} and Celio Pouponnot^{1,2,3,4, *}

¹ Institut Curie, Orsay F-91405, France

² INSERM U1021, Centre Universitaire, Orsay F-91405, France

³ CNRS UMR 3347, Centre Universitaire, Orsay F-91405, France

⁴ Université Paris Sud-11, F-91405 Orsay, France

⁵ CNRS UMR 3306, Centre Universitaire, Orsay F-91405, France

⁶ INSERM U1005, Centre Universitaire, Orsay F-91405, France

⁷ Institut Curie, Paris F-75248, France

⁸ INSERM U830, Centre Universitaire, Orsay F-91405, France

⁹ Département de pédiatrie, Institut Curie, Paris, France

¹⁰ Département de Neuropathologie, Hôpital Sainte-Anne, INSERM UMRS1165, Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, France

¹¹ Present address: Goodman Cancer Research Centre, Department of Biochemistry, McGill University, Montréal, Québec, Canada

¹² INSERM U759, Centre Universitaire, Orsay F-91405, France

¹³ AP-HP, Hôpital Necker-Enfants Malades, Département Neurochirurgie pédiatrique, Paris France

¹⁴ Institute of Neurology, Medical University of Vienna, Austria.

¹⁵ Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, France

Running title : NRL protects MB from apoptosis

Keywords : MAF; NRL; Medulloblastoma; photoreceptor; apoptosis; BCL2

* Corresponding author:

Dr. Celio POUPONNOT

E-mail : celio.pouponnot@curie.fr

Institut Curie - Recherche

Laboratoire 110, Centre Universitaire

91405 - ORSAY Cédex, FRANCE

Tel. 33-1 69 86 30 74

Fax. 33-1 69 86 30 51

ABSTRACT:

Medulloblastoma (MB) is the most common malignant brain tumor of childhood arising in the cerebellum. Although multimodal treatments have significantly increased the survival, 20% to 30% of patients remain incurable. Most of these patients belong to a poorly characterized MB subgroup displaying expression of a retina photoreceptor specific differentiation program. The functional relevance of this aberrant differentiation program to MB remains unknown. Here, we show that this program is instrumental to cancer progression through NRL, one of its key transcription factors. NRL protects MB from apoptosis by inducing the expression of the anti-apoptotic BCL-XL gene. Importantly, we show that anti-BCL therapies could represent an alternative therapeutic strategy for this pediatric tumor.

SIGNIFICANCE:

Cancer cells often express differentiation programs unrelated to their tissue of origin. These aberrant differentiation programs, likely resulting from cancer cell plasticity, are usually not thought to contribute to cancer progression. One particular aggressive subgroup of Medulloblastoma (MB), the most frequent pediatric malignant brain tumor arising in the cerebellum, expresses a photoreceptor differentiation program, normally expressed in the retina. We show that these MBs subvert NRL, a major transcription factor of this program, to its profit and thus, identified one key driver event of this poorly characterized MB subgroup. Our results also revealed a strong sensitivity of MB to anti-BCL therapy. Our results highlight the importance of studying these aberrant differentiation programs that can be required for cancer progression.

HIGHLIGHTS:

- Contribution of the photoreceptor differentiation program to group3 MB through NRL
- First demonstration of oncogenic activity of the MAF family member, NRL
- NRL protects MB from apoptosis by inducing *BCL-XL* expression
- High potential of anti-BCL therapy in MB

INTRODUCTION

Cancers are often characterized by aberrant differentiation programs unrelated to their tissue of origin (Wang et al., 2011). Recently, expression of germline and placental specific genes has been associated to poor prognosis in lung cancer (Rousseaux et al., 2013). Although these programs have a prognostic value, the functional relevance of these ectopically expressed genes to cancer progression remains poorly understood (Emadali et al., 2013). The most aggressive and incurable type of Medulloblastoma (MB) is known to express a photoreceptor differentiation program (Cho et al., 2010; Kool et al., 2008; Northcott et al., 2010; Thompson et al., 2006). Genes from this program are exclusively expressed within the retina and not in the cerebellum, the tissue where MB arises. This program is thought to result from the high plasticity of cancer cells, but not to participate to MB progression.

Medulloblastoma (MB) is a tumor of the cerebellum, which represents the most malignant brain tumor of childhood. Multimodal treatments have allowed to reach 70 to 80% overall survival. Four subgroups of MB have been identified (Northcott et al., 2012b; Taylor et al., 2012). These differ by their clinical characteristics, their driver mutated genes and their cell of origin (Northcott et al., 2012a; Northcott et al., 2012b; Taylor et al., 2012). The WNT subgroup, which shows the best prognosis, is driven by constitutive activation of the WNT/ β -catenin signaling pathway. The SHH subgroup is due to activation of the Sonic Hedgehog pathway, mostly through the loss of the PTCH1 tumor suppressor gene. It is of intermediate prognosis similar to group 4 for which the main driver event remains to be identified. Group 3 MBs, which remain poorly characterized, display the poorest prognosis, most of the incurable patients belonging to this subgroup. The c-MYC oncogene is expressed in this subgroup in some instances due to its amplification (Northcott et al., 2012a). Although c-MYC plays a key role in group 3 MBs, it is not sufficient for tumor initiation (Kawauchi et al., 2012; Pei et al., 2012). It is crucial to identify oncogenes and/or tumor suppressors involved in group 3 carcinogenesis and novel therapeutic targets for this incurable disease. Several transcriptomic analyses have revealed that group 3 MB specifically expresses photoreceptor genes, named "photoreceptor program" hereafter. In physiological conditions, the expression of these genes is not found in the cerebellum but is normally restricted to the retina where they play important roles. Several key transcription factors control the expression of these genes (Swaroop et al., 2010). Among those transcription factors, the Neural Retina

Leucine zipper (NRL) is exclusively expressed in rod photoreceptors and in the pineal gland (Akimoto et al., 2006). Mouse knockout studies have established NRL as a major transcription factor of rod photoreceptor terminal differentiation (Mears et al., 2001; Oh et al., 2007). Its expression starts shortly after the last division of the retinal progenitors at the onset of rod photoreceptors specification (Akimoto et al., 2006). Indeed, it does not control proliferation or survival of retinal precursors but it regulates the expression of photoreceptor specific genes including phototransduction signaling molecules (Swaroop et al., 2010). In agreement with this key role, NRL is mutated in retinitis pigmentosa, a disease caused by the degeneration of the photoreceptors (Bessant et al., 1999).

NRL is a b-ZIP transcription factor which belongs to the large MAF ("Musculo-Aponeurotic-Fibrosarcoma) family (Eychene et al., 2008; Kataoka, 2007), also composed of c-MAF, MAFB and MAFA. Aside from NRL, the oncogenic activity of MAF proteins has been well established *in vitro* and *in vivo* (Eychene et al., 2008). Nevertheless, evidence for their direct involvement in human cancers remains scarce. *c-MAF*, *MAFB* and to a lesser extent *MAFA*, are overexpressed in 10% of multiple myeloma (MM) due to translocations that juxtapose strong enhancers in the vicinity of these genes. They exert their oncogenic activity through overexpression without alteration of their coding sequence (Eychene et al., 2008) and control cell cycle progression by inducing CCND2 expression and pathological interactions between tumor and stromal cells (Eychene et al., 2008; Hurt et al., 2004). In MM, their ectopic expression is of poor prognosis and associated to therapy resistance (Eychene et al., 2008). Although NRL belongs to the MAF family, its oncogenic activity has neither been assessed nor shown to be involved in human cancer, and it is solely viewed as a terminal differentiation factor of the rod photoreceptors (Eychene et al., 2008; Swaroop et al., 2010).

We establish that the photoreceptor differentiation transcription factor NRL can act as an oncogene, conferring to MB cells invasive properties *in vitro* and growth capacities *in vivo*. NRL protects MB from apoptosis by inducing the expression of BCL-XL (BCL2L1). Using different models including patient-derived MB xenografts, we show that MBs are sensitive to a BCL inhibitor. This could represent a potential new therapeutic approach.

Results

The photoreceptor transcription factor is expressed in group 3 MB

Group 3 MBs have been shown to express photoreceptor specific genes (Taylor et al., 2012). We first analyzed the expression profile of the photoreceptor specific *NRL* gene in human MB. *NRL* was highly enriched in group 3 MB and showed no expression in the WNT and SHH groups (Figure 1A and B). The expression of *NRL* was verified by RT-qPCR on a subset of these samples (Figure 1C). A good correspondence was observed between the transcriptomic data and the RT-qPCR results (compare black and grey bars in Figure 1C). As expected from the highly restricted expression pattern of *NRL* (Akimoto et al., 2006), no expression of *NRL* was detected in both embryonic and adult cerebellum by RT-qPCR (Figure 1C). Similar to patient samples, *NRL* was also expressed in some MB cell lines (D458MED) but not in others (DAOY, ONS-76) (Figure 1D). Interestingly, the D458MED cell line expressed characteristic genes of group3 MB, a feature not observed for DAOY and ONS-76 cells (Figure S1), suggesting that D458MED represented a group3 cell line. *NRL* was also expressed in two MB patient-derived xenografts (PDX) (Figure 1D).

Nrl can act as an oncogene

Since the oncogenic role of *NRL* has never been established, we first investigated whether *NRL* overexpression could modulate the transformation of MB cell lines that did not express this gene. We stably expressed *NRL* in DAOY (Figure 2A) and in ONS-76 (Figure S2A) cells and assessed different transforming parameters (Figure 2 and S2). *NRL* increased cell proliferation in low serum conditions (Figure 2B and S2B) as well as anchorage independent growth (Figure 2C), two major characteristics of cell transformation. We next investigated if this ectopic expression altered tumorigenicity *in vivo* by performing subcutaneous (Figure 2D and S2C) and orthotopic grafting (Figure 2E). In both conditions, *NRL* expression strongly increased tumor growth. Since *NRL* was expressed in metastatic group 3 MBs, we investigated if *NRL* could modulate cell migration and invasion (Figure 2F-G). Using videomicroscopy, we showed that *NRL* expression enhanced the migration of these cells by increasing their traveled distance (Figure 2F) and their migration speed (Figure 2G). When cells were seeded in

invasion chambers, NRL expression increased their invasion through matrigel (Figure 2H). Taken together, these results established for the first time that NRL can act as an oncogene and could participate in the acquisition of metastatic traits.

NRL protects MB from apoptosis

In order to investigate if NRL was required for MB tumorigenesis, we undertook loss of function experiments in D458MED, using shRNAs (Figure 3 and 4). We identified two shRNAs that efficiently down regulated NRL expression in D458MED at both the mRNA and protein levels (Figure 3A-B). These cells were then orthotopically grafted in immunodeficient mice and tumor growth was assessed. A major decrease of tumor growth was observed for NRL knock-down (KD) cells (Figure 3C). This was correlated with an increased survival of the injected mice (Figure 3D). No mice injected with the control cells (not infected (NI) 0/15 or infected with a lentivirus encoding a control shRNA (Ctl) 0/15) survived longer than 30 days, while the first dead mouse was observed at 33 days post-injection for cells in which NRL expression was down-regulated. After 80 days of follow-up, 18/30 mice injected with NRL KD cells were still alive (7/15 shRNA#1 and 11/15 for shRNA#2). These results demonstrated that the survival of mice injected with NRL KD cells was strongly increased. To decipher the mechanism by which NRL was required for MB growth, we performed *in vitro* experiments (Figure 4). To assess the specificity of our shRNAs targeting NRL, we compared their effect in NRL-expressing cell line (D458MED) and, as a negative control, in non-expressing cells (DAOY) (Figure 4). Cell proliferation was specifically decreased in NRL KD D458MED cells but not in DAOY cells (Figure 4A). While no change was observed in the cell cycle profile of DAOY, we observed an S phase decrease coupled to a major increase of the subG1 content in NRL KD D458MED cells, suggesting a strong induction of apoptosis. To confirm these observations, we measured the level of cleaved caspase 3 by FACS analysis (Figure 4C). D458MED cells where NRL expression was ablated showed a strong increase in apoptosis from 10% in control cells to more than 30% in KD cells. The basal level of apoptosis was low in DAOY cells and remained unaffected following expression of shRNA targeting NRL (Figure 4C).

Taken together, these results indicated that NRL was required for group 3 MB growth by protecting them from apoptosis. To confirm these results, we investigated the role of NRL in MB patient derived xenografts (PDXs) (Figure 5). PDXs are known to be highly stable and to faithfully recapitulate the original tumor. Two MB PDXs expressing NRL (Figure 1D) were used. Cells from these PDXs could be dissociated and short-term cultured *in vitro* as neurospheres in stem cell conditions. Hereafter, this type of culture is named PDX culture. NRL expression was efficiently knocked-down in these cultures by shRNA using lentiviral infection (Figure 5A and B). As observed in cell lines, NRL extinction strongly decreased the viability of these PDX cultures (Figure 5C). This decrease in viability was correlated to the induction of apoptosis (Figure 5D). To assess whether the cerebellar environment might provide trophic factors bypassing the need for NRL, we performed orthotopic grafting in the cerebellum (Figure 5E). While all mice injected with control PDX cells developed tumors (3/3 mice), only 2/6 mice (1/3 for each shRNA) developed tumors when injected with PDX tumor cells knocked-down for NRL (Figure 5E). In conclusion, the phenotype observed in cell lines was recapitulated with the PDX model, confirming that NRL protected MB from apoptosis.

BCL-XL is an NRL target gene in MB

Since NRL is a transcription factor, we sought for NRL direct target genes involved in MB. We first analyzed the expression profile of known photoreceptor genes in our different models (Figure 6A). Their expression was decreased upon NRL KD in D458MED cells. However, their level of expression remained very low in DAOY cells engineered to express NRL, suggesting that NRL is required but not sufficient for their expression. This suggested that NRL can increase tumorigenicity without triggering the photoreceptor program (Figure 2). We performed a bioinformatic analysis to identify genes whose expression was correlated to that of NRL. Since we demonstrated that NRL protected MB from apoptosis, we looked for the presence of anti-apoptotic genes. We found that expression of *BCL2L1*, an anti-apoptotic gene of the BCL2 family also known as *BCL-XL*, was correlated to that of NRL (Figure 6B and 6C, correlation coefficient > 0.70). Accordingly, although high in other subgroups, BCL-XL expression was enriched in group 3 MB (Figure 6D). We investigated whether *BCL-XL* is a direct target gene of NRL. We identified a potential MAF responsive element (MARE) in

the human *BCL-XL* promoter, matching the consensus sequence (Kataoka et al., 1994) (Figure 6E). To assess if NRL was bound to this sequence in MB, chromatin-IP experiments (ChIP) were performed in D458MED cells and, as negative control, in the non NRL expressing DAOY cell line (Figure 6F). NRL was bound to the MARE containing region of the *BCL-XL* promoter in D458MED cells but not to its 3' UTR (Figure 6F). As expected, NRL enrichment was found neither in its promoter, nor in its 3'UTR in DAOY cells. We further showed that NRL controlled *BCL-XL* expression. When NRL was stably expressed in DAOY or in ONS-76 cells (Figure 6G and Figure S2D), we observed an increase of *BCL-XL* expression and a strong decrease when NRL expression was down-regulated in D458MED cells and in PDX cultures (Figure 6G). These changes at the mRNA level were also observed at the protein level. Taken together, our data strongly supported that BCL-XL is a direct NRL target gene (Figure 6H). To investigate the role of BCL-XL in MB, we knocked-down its expression by shRNA (Figure 6I-J) and observed a strong induction of apoptosis (Figure 6K). Taken together these results supported that NRL protected MB from apoptosis, at least in part by inducing *BCL-XL* expression which represented a potential therapeutic target.

TW37 as a potential therapeutic agent in MB

We next assessed whether MBs were sensitive to an inhibitor of the BCL2 family. D458MED cells or PDX cultures were treated with the BCL inhibitor TW37 *in vitro*. While this treatment had no effect on non-cancerous cells (RPE-1), it strongly decreased the viability of the D458MED cell line as well as that of PDX cultures (Figure 7A). This was correlated to a dramatic increase in apoptosis (Figure 7B). We also showed that this type of treatment was efficient *in vivo*. Mice orthotopically grafted with the D458MED cells or with the PDX1 were treated 2 days later (Figure 7C-H). A major decrease in tumor formation was observed following TW37 treatment for both the D458MED cell line and the PDX. This resulted in a major increase of survival in both models (Figure 7E and 7H). We next tested whether TW37 could decrease tumor growth on established MBs (Figure 7I-K). Mice were orthotopically grafted with D458MED cells and were left untreated to allow tumor formation. Once the tumor was formed (day 9 post injection), mice were separated into two groups: control or treated with TW37 (Figure 7I-K) and the tumor growth was followed. TW37 treatment not only diminished

the tumor progression but also decreased the tumor mass (7I-J). This resulted in an increase in mouse survival (Figure 7K). While 1/7 mice survived after 18 days and 0/7 survived after 36 days in the control group, the first dead mouse in the treated group was found at day 36 (Figure 7K). 4/7 mice showed a strong decrease of the tumor mass with a near complete disappearance of the luciferase signal (Figure 7K). Although left untreated since day 18, these mice were still alive after more than 70 days, strongly suggesting that they were cured by the treatment (Figure 7K).

Discussion

The most aggressive and incurable type of MB aberrantly expresses a photoreceptor differentiation program of unknown significance (Taylor et al., 2012). Our results established that these MBs subvert NRL, one key transcription factor of this program, to their profit. Although NRL controls part of this program, it can increase tumorigenicity without inducing photoreceptor genes. Our results do not exclude that some genes of this program may participate in MB progression but clearly established that *BCL-XL*, which does not belong to it, is a key NRL target gene in this process. Taken together, our results led us to propose the following model (Figure 8). Alterations of epigenetic factors known to be frequent in MB (Archer and Pomeroy, 2012; Batora et al., 2014; Robinson et al., 2012; Schwalbe et al., 2013) would allow the ectopic expression of key photoreceptors transcription factors, including NRL. This eventually results in the expression of the entire program (Figure 8 in blue). Once NRL is expressed, it also induces genes outside of this program (Figure 8 in red) that are required for MB progression (Figure 8). Thus, our results explain the presence of the photoreceptor program and uncover its contribution to group 3 MBs.

We established for the first time that the photoreceptor specific transcription factor NRL, a MAF family member, can act as a driver oncogene. These conclusions are based on gain and loss of function experiments not only in cell lines but also in patient-derived xenografts. Considering its physiological role, NRL oncogenic activity appears somehow surprising. In a physiological context, its expression is restricted to the retina (Akimoto et al., 2006), where it plays a key role in the establishment of rod

photoreceptor differentiation program (Mears et al., 2001). Accordingly, we showed that NRL is partly responsible for its expression in group 3 MBs. Indeed, knock-down of NRL decreased key genes of the photoreceptor program (Rhodopsin, Phosducin, Recoverin) (Figure 6A). Nevertheless, expression of NRL in DAOY or ONS-76 was not sufficient to induce this program (Figure 6A and not shown) although it increased tumorigenicity. Thus, NRL can exert oncogenic activity independently of these genes. We established that NRL is required for MB growth by protecting cells from apoptosis. Using several experimental approaches, we identified *BCL-XL* as a key target gene of NRL in this process. In physiological conditions, NRL does not protect photoreceptors from apoptosis and *BCL-XL* has never been shown to be an NRL target gene (Mears et al., 2001; Montana et al., 2013). Thus, its oncogenic activity appears to be uncoupled from its physiological role, a hallmark of Maf transforming activity (Eychene et al., 2008). Indeed, MAF proteins are atypical oncogenes, which exert their transforming activity in cells where they are not normally expressed. Their physiological target genes differ from those identified in oncogenic processes. The involvement of NRL in MB is in line with this model. MAF oncogenic activity has never been associated with the protection against apoptosis. Nevertheless, a recent report showed that BCL-XL is overexpressed in MAF expressing MM (Gomez-Bougie and Amiot, 2013). This suggests that MAF may also protect MM against apoptosis through BCL-XL induction and that anti-BCL therapy may be considered for MAF expressing MMs that are also resistant to current therapies (Munshi et al., 2011).

In patients suffering from MB, current therapies that associate surgery, chemotherapy and radiotherapy lead to survival of approximately 70% to 80%. Nevertheless, 20% to 30% of patients remain incurable due to resistance to these therapies and the survivors suffer from disabling secondary effects due, in part, to the toxicity of radiotherapy (Lantering et al., 2012; Taylor et al., 2012). We brought the proof of principle of the potential efficacy of anti-BCL therapy for MBs. First, we validated BCL-XL as a potential target in MB. shRNA-mediated extinction of BCL-XL strongly induced apoptosis *in vitro*. We obtained similar effects with TW37, a pharmacological inhibitor of the BCL family. *In vivo*, TW37 prevented tumor growth of both orthotopically grafted MB cell line and patient-derived xenografts, known to faithfully recapitulate the original tumor. We showed that anti-

BCL therapy not only prevented tumor growth but also, more importantly, induced a major reduction of the tumor size on pre-existing tumors. A near complete regression of the tumor was observed in some animals. Importantly, no adverse effect of the treatment was observed and more than 60% of the treated mice are still alive and healthy. Therefore, these mice can be considered cured by the anti-BCL therapy as a single agent. Genotoxic agents have been demonstrated to synergize with anti-BCL therapies (Juin et al., 2013). Although our results suggest that an anti-BCL therapy could be effective as a single agent, its association with current therapies may benefit to patients bearing MBs. This combination may deserve further study in order to assess whether it could be advantageously used in the treatment of otherwise heavily treated pediatric patients. Taken together, our report highlights the high potential of anti-BCL therapy for MB patients.

In conclusion, as observed in the most aggressive form of MB, cancers often express aberrant differentiation programs unrelated to their tissue of origin. Here, we showed that such a program is instrumental to MB progression through one of its main transcription factors. Our results established the importance of these disregarded programs often considered a "side effect" of cancer cell plasticity. Understanding these programs may help to identify novel therapeutic targets in cancer.

Experimental Procedures

Constructs and transfection

The pcDNA3-NRL plasmid was obtained by inserting the NRL coding region into the BamH1 and EcoRI restriction sites of the pcDNA3 vector (Invitrogen). The pcDNA3 Luciferase was obtained by subcloning the Luciferase cassette from the PGL2Luc vector (Promega). The lentiviral vector pCCL-c-MNDI3c-LUC-PGK-EGFP coding for the Luciferase and GFP genes was described elsewhere (Duy et al., 2011). The PLKO constructs encoding shRNA ctrl, shRNA NRL#1, NRL#2 and BCLxL#1 and BCL-XL#2 were purchased from Sigma-Aldrich.

Cell culture conditions

Medulloblastoma cell lines (D458MED (obtained from Dr. Bigner) (He et al., 1991), DAOY, ONS-76) were cultured in improved MEM, MEM and RPMI 1640 medium (GIBCO), respectively, supplemented with 10% fetal bovine serum (GIBCO), 100 units/mL penicillin, and 100 µg/mL streptomycin (Invitrogen), 1.25 µg/ml fungizone (Invitrogen). DAOY Medium was supplemented with 0.1mM non-essential amino acids and 1mM sodium pyruvate. Human retina pigmented epithelium cells immortalized with hTERT (hTERT-RPE-1, named RPE-1) were cultured in DMEM:F12 medium (Gibco) supplemented with 10% fetal bovine serum (GIBCO), 100 units/mL penicillin, and 100 µg/mL streptomycin (Invitrogen), 1.25µg/ml fungizone (Invitrogen). All cells were cultured at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂.

Microarray analyses

Human MB samples and hybridization on Affymetrix U133Plus2.0 were described elsewhere (Fattet et al., 2009). Gene expression data was normalized using gcRMA algorithm on custom Brainarray CDF (Dai et al., 2005). After elimination of background and invariant genes, MB samples were classified into the 4 molecular subgroups (Northcott et al., 2010) by unsupervised hierarchical clustering using Pearson's standard correlation as similarity measure and average linkage. [...] Heatmaps were performed after scaling expression data and Pearson's correlation was estimated between NRL and Bcl-xL expression. All these analyses were performed with R software environment.

Patient-derived xenografts and PDX cultures

Group 3 MB patient-derived xenografts (PDXs) were developed from primary tumor samples of previously untreated patients, implanted into the neck fat pad of NSG mice. In all cases, primary human brain tumor specimens were obtained under written informed consent approved by the Internal Review Board of the Necker Sick Children's Hospital, Paris, France. The care and use of animal studies at Institut Curie (Orsay, France) were performed in strict accordance to the European and National Regulations in force for the Protection of Vertebrate Animals used for experimental and other scientific purposes (directive 86/609). The protocol also complied with internationally established 3R principles, in accordance with the UKCCCR guidelines. Once established, PDXs were maintained by serial passages in nude mice. For *in vitro* cultures, tumors were dissociated in a buffer containing 1mg/ml DNaseI (Worthington Biochemicals), 2.5mg/ml Collagenase P (Roche), 2.5mg/ml Collagenase/dispase (Roche), B27 supplement (Invitrogen), N2 supplement (Invitrogen), Neurobasal medium (Gibco). Then, they were cultured in Neurobasal medium (Gibco) supplemented with B27 supplement (Invitrogen), N2 supplement (Invitrogen), 0.01% BSA solution (Invitrogen), 1% L-Glutamine (Invitrogen), 1% penicillin/streptomycin (Invitrogen) and 20ng/ml human bFGF/EGF (Peprotech), in low adhesion flasks (Sigma-Aldrich).

ShRNA and lentiviral production and infection

Lentiviral pLKO vectors encoding shRNA targeting NRL (NM_006177, clones TRCN0000015372 for shNRL#1, TRCN0000015369 for shNRL#2 or BCL-XL (NM_001191 TRCN0000033499 for shBcl-xL #1 and TRCN0000033500 for shBcl-xL#2) were obtained from Sigma-Aldrich. Lentiviruses were produced in 293T cells, by co-transfecting pLKO-derived vectors and the packaging plasmids pS-PAX2 and pMD2-VSVG, using lipofectamine 2000 (Invitrogen). Lentiviral particles were harvested 48-60-72 h post-transfection. 2×10^6 D458Med and 5×10^5 DAOY were infected and selected with puromycin (1 μ g/ml).

Real time RT-PCR

Total RNAs were extracted using RNeasy Plus mini kit (Qiagen) and reversely transcribed with the Cloned AMV First-Strand cDNA Synthesis Kit (Invitrogen). Quantitative real-time PCR assays were conducted using SYBR Green real-time PCR Master Mix and real-time PCR amplification equipment (Applied Biosystem).

Western blotting and antibodies

Cell extracts and Western blot were performed as previously described (Rocques et al., 2007). Membranes were probed with anti-NRL (AF2945, R&D systems, 1/1000), anti-Bcl-xL (mAb #2767, Cell signaling, 1/1000), anti- β actin (A1978, Sigma, 1/5000) antibodies, at 4°C overnight. Signals were acquired using a CDD camera (G:BOX, Syngene).

Apoptosis and cell cycle analyses by flow cytometry

Cells (5×10^5 cells/well) were grown in 6 well plates for 72 h. Apoptosis was measured using the Caspase-3 active form (cleaved Caspase-3) mAb Apoptosis Kit, FITC (BD bioscience). The signals were detected by a FACScalibur cytometer (BD biosciences). The percentage of apoptotic cells was determined using FlowJo software (Tree Star)

Cell cycle analysis was performed using APC BrdU flow kit (BD bioscience). The signals were detected a by FACScalibur cytometer (BD biosciences) and analyzed using FlowJo software (Tree Star).

Growth curves and soft agar colony formation assay

For growth curves, 10^5 DAOY and ONS-76 cells were seeded into 6-well plates in medium containing 0.2% FCS. D458MED cells were seeded into 12-well plates at a density of 5×10^5 cells/ml in medium containing 10% FCS. Cultures were then stained with Trypan blue and the viable cells were counted at regular interval. Cell viability assay based on luciferase activity

was done using Cell titer Glo kit (Promega). Soft agar colony formation assay was performed at a density of 7.5×10^4 cells as previously described (Pouponnot et al., 2006; Rocques et al., 2007).

Migration and Invasion assays

For cell migration assays, 2×10^4 DAOY were seeded in 6-well plates and followed during 12h. Cell motility was analyzed by time-lapse videomicroscopy using an inverted microscope, equipped with a small transparent environmental chamber, at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% (v/v) CO₂. The microscope was driven by the Metamorph software (Roper Scientific) and images were recorded with a charge-coupled device camera CoolsnapHQ. Cell speed (µm/min) was quantified by tracking cells with Image J software. For cell invasion assay, 10^4 DAOY cells were seeded on 8µm pore-transwell inserts coated with a uniform layer of growth factor reduced matrigel (BD bioscience) and cultured in 0.2% FCS-medium. In the bottom chamber, medium containing 10% FCS was used as a chemo attractant. After 16h of incubation, the cells that migrated through the membranes were fixed and stained in a 20% ethanol/ crystal violet solution. The number of cells was counted for the entire well (photo x4), using ImageJ software.

Subcutaneous injection

10×10^6 tumor cells were injected in the right flank of 5-week female mice Swiss Nude (CRL). Tumor growth was measured every week.

Orthotopic transplantation and bioluminescence imaging of tumor growth

5-week old female Swiss Nude (CRL) mice were anesthetized with 2.5% isoflurane and locally with bupivacaine. The head was fixed in a stereotaxic frame (Kopf Instruments) using

ear bars. A small incision was made into the skull 2 mm lateral and 2 mm anterior to the Lambda using a 25G needle. 10^5 cells expressing luciferase were injected into the right caudate/putamen to a depth of 3 mm through a Hamilton syringe at a rate of 1 μ l/min using a microinjection system. Mice were injected with buprenorphine and monitored for signs of paralysis and distress. Tumor growth was followed with luciferase activity of injected cells. Mice were given intraperitoneal injections of 50 mg/kg D-Luciferin (Caliper Life Sciences) and anesthetized with 2.5% isoflurane. 15 min after injection, animals were imaged using the Xenogen Ivis Spectrum imaging system (Perkin-Elmer) and Living image software. At the end of the experiment, mice were euthanized and brains were collected. Brains were immediately fixed in 4% formaldehyde and then embedded in paraffin using conventional systems. 5 μ m sections were stained with hematoxylin-eosin (HE) or for the proliferative marker Ki67 (NCL-Ki67p, Leica Biosystems, 1/500)

Inhibitor treatment

For in vitro tests, the TW37 inhibitor (Selleckchem) was used at a concentration of 1 μ M or 5 μ M in DMSO. In vivo, Swiss Nude mice were injected orthotopically with luciferase expressing cells. 3 days after injection, mice were treated with 30mg/kg of TW37 (in vehicle: PBS/Tween 80/ethanol) as indicated in the figures. Tumor growth was followed by bioluminescence as described above. At the end of the experiment, mice were euthanized and brains were collected and fixed overnight in 4% formaldehyde/PBS.

Chromatin ImmunoPrecipitation (ChIP)

For ChIP, 30×10^6 D458MED or DAOY cells were cross-linked with 1% formaldehyde for 10 min at 37°C and lysed in a buffer containing 1% SDS, 10mM EDTA and 50mM Tris pH 8.1. Sonicated chromatin was immunoprecipitated for 3h with 0.4 μ g of NRL antibody (AF2945, R&D systems) or with IgG as a negative control (sc-2028, Santa-Cruz). Immunoprecipitated

chromatin was eluted in a buffer containing 1% SDS- 0.1M NaHCO₃). The cross-links were reversed by the addition of NaCl (200mM final) for 4h at 65°C. DNA was extracted using phenol-chloroform. Real-time quantitative PCR was performed using SYBR Green realtime PCR Master Mix (Applied Biosystems) with specific primers in promoter or 3'UTR (negative control) of genes: Sense, 5'-TCCTGTAAGCGAGTCTGCTG-3' and antisense, 5'-TGGTGAAACCCCGTCTCTAC-3' for BclxL promoter (109 bp); Sense, 5'-CATCCCTACCCCTAAGAGC-3' and antisense, 5'-GCTTCTGGAGGACATTTGGA-3' for Bcl-xL 3'UTR (145 bp). Analysis of an input sample was used to normalize each sample (ΔCt (normalized CHIP)=(Ct(chip)-(Ctinput-log₂(input dilution factor))), and then fold induction was measured by comparison of NRL antibody and IgG antibody precipitation.

Magnetic resonance imaging (MRI)

MRI experiments were performed on a small animal MRI system (Agilent), equipped with a 9.4T vertical magnet, a 500mT/m shielded micro-imaging gradient system, and a 40 mm inner diameter Millipede linear radiofrequency probe. Animals were anesthetized with isoflurane (AErrane, Baxter France, France), 4% for induction and 1–2% for maintenance in a mixture of N₂ (80 vol %) and O₂ (20 vol %). Body temperature was stabilized and respiration rate was monitored. A multi-slice (19 slices) multi echo sequence was used: TR/TE = 1000/10ms, FOV=30x30 mm², matrix = 256 x 128, slice thickness = 1 mm. Images shown in Figure 2E were acquired about 22 minutes after IP injection of Gd-DOTA (Dotarem, Guerbet, France): 100µl, 100mM.

Acknowledgments

We thank members of our laboratory for helpful advice and comments, Isabelle Dusanter and Dominique Duménil for the transfer of the lentiviral technology, C. Lasgi for her assistance in FACS analyses and C. Alberti and E. Belloir at the Institut Curie mouse facilities.

This work was funded by grants from Ligue Nationale Contre le Cancer (Essonne-Oise-Yvelines #M18759, #M16649), and Fondation de France (#2009006690). AG was supported by a fellowship from the Ministère Français de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

Figure Legends

Figure 1: NRL is expressed in group 3 Medulloblastomas. (A) Heatmap showing the expression level of NRL in different human MB samples and in normal adult cerebellum. The different subgroups are indicated on the top. (B) Boxplots representing the expression of NRL in the different subgroups. (C) Expression level of NRL in different MB samples obtained by microarray (black bars) and by RT-qPCR (grey bars). (D) RT-qPCR analysis of NRL expression in different cell lines and two MB patients-derived xenografts (MB PDX).

Figure 2: NRL can act as an oncogene in MB. DAOY were stably transfected with a control vector alone (vect, in black) or with an NRL-encoding vector (NRL, in grey). (A) Western blot analysis of ectopic NRL expression in transfected DAOY cells. The parental DAOY is shown (-). (B) Growth curve on DAOY cultures stably expressing NRL or not in low serum condition (0.2% FCS). (C) Anchorage independent growth of the different DAOY cultures assessed by colony formation in soft agar. Representative photographs (left) and quantification (right). (D) The different cultures were grafted subcutaneously in nude mice and tumor growth was followed. Representative tumors are shown on the top and the average of tumor size is shown on the bottom. Mice were grafted with NRL expressing DAOY (n=12) and with control cells (n=11). (E) DAOY cells stably expressing the luciferase gene were generated to monitor tumor growth by bioluminescence (IVIS). Images of 2 representative mice from each group at the end of the experiment are shown on the left (bioluminescence signal on the top and MRI signal on the bottom). The average of the light signal for each group (n=9 vect in black and n=10 NRL in grey) during the course of the experiments is represented on the right. (F-G) Migration of the DAOY cultures was tracked by videomicroscopy. (F) A representative field showing the path of the individual cells during the course of the experiment is presented and (G) the average speed ($\mu\text{m}/\text{min}$) quantified. (H) DAOY cultures were seeded on

matrigel invasion chamber and their ability to migrate through the matrigel was quantified. *p-value<0.01, **p-value<0.001 and ***p-value<0.0001.

Figure 3: Down regulation of NRL decreases MB growth and increases survival *in vivo*. (A) RT-qPCR of D458MED cells infected by lentivirus encoding control shRNA (Ctl, black bar) or targeting NRL (red bars). Two independent shRNAs were identified to efficiently knock down NRL (shNRL#1 and shNRL#2). (B) WB of these cultures. (C) D458MED cultures stably expressing the luciferase gene were generated. These cells were orthotopically grafted into the cerebellum of NUDE mice (NI: not infected (black diamonds), Ctl: shRNA control (black squares), shNRL#1 and #2 (red triangles and squares)). 15 mice of each group were analyzed (n=15). Tumor growth was followed by light emission during the course of the experiment. Results are graphed on the right panel and a representative image of light emission is shown at day 18 on the left. (D) Kaplan Meier survival curves of these mice. The number of survival mice on the total number of mice is indicated for each group. *p-value<0.01, **p-value<0.001 and ***p-value<0.0001

Figure 4: NRL protects MB from apoptosis. Effect of shRNA-mediated NRL down-regulation in the D458MED NRL expressing cells or in DAOY non-expressing cells, as a negative control. ShRNA control (Ctl) (Black) and two shRNAs targeting NRL were used (shNRL#1 and shNRL#2) (red). (A) growth curve analysis. Cells were counted at regular intervals as indicated. (B) Cell cycle analysis by FACS. (C) Apoptotic content measured by cleaved caspase 3 by FACS. ***p-value<0.0001

Figure 5: NRL protects MB patient-derived xenografts (PDX) from apoptosis. Effect of shRNA mediated NRL down-regulation in two MB PDXs. PDXs were short term cultured in stem conditions (PDX culture 1 and 2). These cultures were not infected (NI, in black) or infected by lentiviruses encoding a control shRNA (Ctl, in black) or NRL-targeting shRNA (shNRL#1 and shNRL#2, in red). Downregulation of NRL was verified by RT-qPCR (A) or by WB (B). (C) Cell viability was measured by luminescence (Cell titer Glo Promega) and (D) the percentage of apoptosis was assessed by FACS.

(E) The PDX culture 1 was orthotopically grafted in Nude mice (n=3 per group). Mice were monitored weekly and the entire cohort (n=9) was sacrificed when the first MB symptoms were detected in the first animal. MB was verified by H&E staining on sections. As indicated on the top, 3/3 control mice developed MBs while only 1/3 mouse developed MB for each NRL knockdown MB PDX. *p-value<0.01 and **p-value<0.001

Figure 6: BCL-XL is a target of NRL

(A) Relative expression of selected NRL target genes in photoreceptors (Rho: Rhodopsin, PDC: Phosducin, RCVRN: Recoverin) was measured by RT-qPCR in parental D458MED (-), control D458MED (Ctl) or in NRL KD D458MED (shNRL#1 and shNRL#2) and in parental DAOY (-), control DAOY (vect), DAOY engineered to stably express NRL (NRL), as indicated. The level of expression was set at 1 for parental DAOY (-). (B) Heatmap showing the respective expression of NRL and BCL-XL in MB samples by microarray. Subgroups are indicated on the top. (C) Correlation between the expression of NRL and BCL-XL (correlation score is >0.7). The subgroups were indicated by different colors (WNT (blue), SHH (red), group3 (yellow) and group4 (green)). (D) Boxplot showing the expression of BCL-XL in the different subgroups. (E) The human BCL-XL promoter is depicted. The potential MARE (Maf-Responsive-Element) in the hBCL-XL promoter was compared to the MARE consensus sequence and to characterized MAREs of established MAF target genes. (F) ChIP analysis of two different regions of the BCL-XL locus, the MARE-containing region of the promoter and the 3' UTR (negative control) by qPCR using NRL antibody (IP NRL) or a control antibody (IP Ctl) in D458MED and, as a negative control, in the NRL non-expressing cells DAOY. (G-H) Relative expression level of BCL-XL by RT-qPCR (G) or by WB (H) in DAOY stably expressing NRL (NRL) relative to control DAOY transfected with the empty vector (vect), in D458MED or in PDX culture 1 & 2 following downregulation of NRL by shRNA (shNRL#1 and #2) relative to control shRNA (ctl). The level of BCL-XL mRNA was set at 1 for controls. (I) RT-qPCR on parental D458MED (-), infected by lentivirus encoding a control shRNA (Ctl) or shRNAs targeting BCL-XL (shBCL-xL#1 and #2). (J) WB on these cultures. (K) The percentage of apoptosis was assessed in these different cultures. *p-value<0.01 and **p-value<0.001

Figure 7: The BCL inhibitor TW37 affects MB growth *in vitro* and *in vivo*.

The effect of TW37 (shown in grey) was compared to vehicle (shown in black) on different models *in vitro* and *in vivo*. (A) Cell viability was measured *in vitro* by luminescence using Cell titer Glo assay in control or in TW37 treated cells as indicated (RPE: non cancerous hTERT-immortalized retinal pigment epithelial cell line). Cells were treated every 2 days with 5 μ M of TW37. (B) Apoptosis was assessed by measuring cleaved caspase 3 levels by FACS 48h after seeding in control condition or upon TW37 treatment (1 and 5 μ M). (C-H) D458MED (n=9 for each group) (C-E) and PDX1 (n=3 for each group) (F-H) stably expressing the luciferase were orthotopically grafted in the cerebellum of nude mice. Intravenous injection of TW37 (20mg/kg) or vehicle was started 2 days later. Protocols of treatment are indicated (top of panels C and F). Tumor growth was assessed by bioluminescence using IVIS imaging. (C and F, left panels) An image of luciferase signal on representative animals is shown. (C and F right panels) Quantification of the bioluminescence signal for each individual mouse and (D and G) its average for each group. (E and H) Kaplan Meier survival curves. (I-K) The effect of TW37 treatment was assessed on established tumors upon orthotopical grafting of the luciferase expressing D458MED. Mice were left untreated for 9 days until tumor growth is well established (luciferase signal of $\sim 10^5$ photons/s). Mice were treated twice during 3 days (n=7 for each group vehicle (Ctl) vs TW37 at 20mg/kg) as indicated (panel I top, treatment protocol is depicted). (I) Tumor growth was estimated by bioluminescence quantification for each individual mouse or (J) an average of the signal was calculated for each group. (I, left panel) Representative image of the bioluminescence signal observed at the start of the treatment (day 9) and just after the last treatment (day 19). (K) Survival for each group. ***p-value<0.0001

Figure 8: A model depicting the role of the photoreceptor program in group 3 MB. MB subverts the photoreceptor specific transcription factor NRL (See discussion for details).

Bibliographie

- Akimoto, M., Cheng, H., Zhu, D., Brzezinski, J. A., Khanna, R., Filippova, E., Oh, E. C., Jing, Y., Linares, J. L., Brooks, M., *et al.* (2006). Targeting of GFP to newborn rods by Nrl promoter and temporal expression profiling of flow-sorted photoreceptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 3890-3895.
- Archer, T. C., and Pomeroy, S. L. (2012). Medulloblastoma biology in the post-genomic era. *Future Oncol* *8*, 1597-1604.
- Batora, N. V., Sturm, D., Jones, D. T., Kool, M., Pfister, S. M., and Northcott, P. A. (2014). Transitioning from genotypes to epigenotypes: Why the time has come for medulloblastoma epigenomics. *Neuroscience* *264C*, 171-185.
- Bessant, D. A., Payne, A. M., Mitton, K. P., Wang, Q. L., Swain, P. K., Plant, C., Bird, A. C., Zack, D. J., Swaroop, A., and Bhattacharya, S. S. (1999). A mutation in NRL is associated with autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Nat Genet* *21*, 355-356.
- Cho, Y. J., Tsherniak, A., Tamayo, P., Santagata, S., Ligon, A., Greulich, H., Berhoukim, R., Amani, V., Goumnerova, L., Eberhart, C. G., *et al.* (2010). Integrative Genomic Analysis of Medulloblastoma Identifies a Molecular Subgroup That Drives Poor Clinical Outcome. *J Clin Oncol*.
- Dai, M., Wang, P., Boyd, A. D., Kostov, G., Athey, B., Jones, E. G., Bunney, W. E., Myers, R. M., Speed, T. P., Akil, H., *et al.* (2005). Evolving gene/transcript definitions significantly alter the interpretation of GeneChip data. *Nucleic Acids Res* *33*, e175.
- Duy, C., Hurtz, C., Shojaee, S., Cerchietti, L., Geng, H., Swaminathan, S., Klemm, L., Kweon, S. M., Nahar, R., Braig, M., *et al.* (2011). BCL6 enables Ph⁺ acute lymphoblastic leukaemia cells to survive BCR-ABL1 kinase inhibition. *Nature* *473*, 384-388.
- Emadali, A., Rousseaux, S., Bruder-Costa, J., Rome, C., Duley, S., Hamaidia, S., Betton, P., Debernardi, A., Leroux, D., Bernay, B., *et al.* (2013). Identification of a novel BET bromodomain inhibitor-sensitive, gene regulatory circuit that controls Rituximab response and tumour growth in aggressive lymphoid cancers. *EMBO Mol Med* *5*, 1180-1195.
- Eychene, A., Rocques, N., and Pouponnot, C. (2008). A new MAFia in cancer. *Nat Rev Cancer* *8*, 683-693.
- Fattet, S., Haberler, C., Legoix, P., Varlet, P., Lellouch-Tubiana, A., Lair, S., Manie, E., Raquin, M. A., Bours, D., Carpentier, S., *et al.* (2009). Beta-catenin status in paediatric medulloblastomas: correlation of immunohistochemical expression with mutational status, genetic profiles, and clinical characteristics. *J Pathol* *218*, 86-94.
- Gomez-Bougie, P., and Amiot, M. (2013). Apoptotic Machinery Diversity in Multiple Myeloma Molecular Subtypes. *Front Immunol* *4*, 467.
- He, X. M., Wikstrand, C. J., Friedman, H. S., Bigner, S. H., Pleasure, S., Trojanowski, J. Q., and Bigner, D. D. (1991). Differentiation characteristics of newly established medulloblastoma cell lines (D384 Med, D425 Med, and D458 Med) and their transplantable xenografts. *Lab Invest* *64*, 833-843.
- Hurt, E. M., Wiestner, A., Rosenwald, A., Shaffer, A. L., Campo, E., Grogan, T., Bergsagel, P. L., Kuehl, W. M., and Staudt, L. M. (2004). Overexpression of c-maf is a frequent oncogenic event in multiple myeloma that promotes proliferation and pathological interactions with bone marrow stroma. *Cancer Cell* *5*, 191-199.
- Juin, P., Geneste, O., Gautier, F., Depil, S., and Campone, M. (2013). Decoding and unlocking the BCL-2 dependency of cancer cells. *Nat Rev Cancer* *13*, 455-465.
- Kataoka, K. (2007). Multiple mechanisms and functions of maf transcription factors in the regulation of tissue-specific genes. *J Biochem (Tokyo)* *141*, 775-781.
- Kataoka, K., Noda, M., and Nishizawa, M. (1994). Maf nuclear oncoprotein recognizes sequences related to an AP-1 site and forms heterodimers with both Fos and Jun. *Mol Cell Biol* *14*, 700-712.
- Kawauchi, D., Robinson, G., Uziel, T., Gibson, P., Rehg, J., Gao, C., Finkelstein, D., Qu, C., Pounds, S., Ellison, D. W., *et al.* (2012). A mouse model of the most aggressive subgroup of human medulloblastoma. *Cancer Cell* *21*, 168-180.
- Kool, M., Koster, J., Bunt, J., Hasselt, N. E., Lakeman, A., van Sluis, P., Troost, D., Meeteren, N. S., Caron, H. N., Cloos, J., *et al.* (2008). Integrated genomics identifies five medulloblastoma subtypes

with distinct genetic profiles, pathway signatures and clinicopathological features. *PLoS ONE* 3, e3088.

Lannering, B., Rutkowski, S., Doz, F., Pizer, B., Gustafsson, G., Navajas, A., Massimino, M., Reddingius, R., Benesch, M., Carrie, C., *et al.* (2012). Hyperfractionated versus conventional radiotherapy followed by chemotherapy in standard-risk medulloblastoma: results from the randomized multicenter HIT-SIOP PNET 4 trial. *J Clin Oncol* 30, 3187-3193.

Mears, A. J., Kondo, M., Swain, P. K., Takada, Y., Bush, R. A., Saunders, T. L., Sieving, P. A., and Swaroop, A. (2001). Nrl is required for rod photoreceptor development. *Nat Genet* 29, 447-452.

Montana, C. L., Kolesnikov, A. V., Shen, S. Q., Myers, C. A., Kefalov, V. J., and Corbo, J. C. (2013). Reprogramming of adult rod photoreceptors prevents retinal degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 1732-1737.

Munshi, N. C., Anderson, K. C., Bergsagel, P. L., Shaughnessy, J., Palumbo, A., Durie, B., Fonseca, R., Stewart, A. K., Harousseau, J. L., Dimopoulos, M., *et al.* (2011). Consensus recommendations for risk stratification in multiple myeloma: report of the International Myeloma Workshop Consensus Panel 2. *Blood* 117, 4696-4700.

Northcott, P. A., Jones, D. T., Kool, M., Robinson, G. W., Gilbertson, R. J., Cho, Y. J., Pomeroy, S. L., Korshunov, A., Lichter, P., Taylor, M. D., and Pfister, S. M. (2012a). Medulloblastomics: the end of the beginning. *Nat Rev Cancer* 12, 818-834.

Northcott, P. A., Korshunov, A., Pfister, S. M., and Taylor, M. D. (2012b). The clinical implications of medulloblastoma subgroups. *Nat Rev Neurol* 8, 340-351.

Northcott, P. A., Korshunov, A., Witt, H., Hielscher, T., Eberhart, C. G., Mack, S., Bouffet, E., Clifford, S. C., Hawkins, C. E., French, P., *et al.* (2010). Medulloblastoma Comprises Four Distinct Molecular Variants. *J Clin Oncol*.

Oh, E. C., Khan, N., Novelli, E., Khanna, H., Strettoi, E., and Swaroop, A. (2007). Transformation of cone precursors to functional rod photoreceptors by bZIP transcription factor NRL. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 1679-1684.

Pei, Y., Moore, C. E., Wang, J., Tewari, A. K., Eroshkin, A., Cho, Y. J., Witt, H., Korshunov, A., Read, T. A., Sun, J. L., *et al.* (2012). An animal model of MYC-driven medulloblastoma. *Cancer Cell* 21, 155-167.

Pouponnot, C., Sii-Felice, K., Hmitou, I., Rocques, N., Lecoin, L., Druillennec, S., Felder-Schmittbuhl, M. P., and Eychene, A. (2006). Cell context reveals a dual role for Maf in oncogenesis. *Oncogene* 25, 1299-1310.

Robinson, G., Parker, M., Kranenburg, T. A., Lu, C., Chen, X., Ding, L., Phoenix, T. N., Hedlund, E., Wei, L., Zhu, X., *et al.* (2012). Novel mutations target distinct subgroups of medulloblastoma. *Nature* 488, 43-48.

Rocques, N., Abou Zeid, N., Sii-Felice, K., Lecoin, L., Felder-Schmittbuhl, M. P., Eychene, A., and Pouponnot, C. (2007). GSK-3-Mediated Phosphorylation Enhances Maf-Transforming Activity. *Mol Cell* 28, 584-597.

Rousseaux, S., Debernardi, A., Jacquiau, B., Vitte, A. L., Vesin, A., Nagy-Mignotte, H., Moro-Sibilot, D., Bricchon, P. Y., Lantuejoul, S., Hainaut, P., *et al.* (2013). Ectopic activation of germline and placental genes identifies aggressive metastasis-prone lung cancers. *Sci Transl Med* 5, 186ra166.

Schwalbe, E. C., Williamson, D., Lindsey, J. C., Hamilton, D., Ryan, S. L., Megahed, H., Garami, M., Hauser, P., Dembowska-Baginska, B., Perek, D., *et al.* (2013). DNA methylation profiling of medulloblastoma allows robust subclassification and improved outcome prediction using formalin-fixed biopsies. *Acta Neuropathol* 125, 359-371.

Swaroop, A., Kim, D., and Forrest, D. (2010). Transcriptional regulation of photoreceptor development and homeostasis in the mammalian retina. *Nat Rev Neurosci* 11, 563-576.

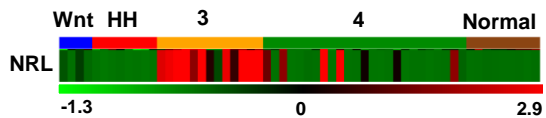
Taylor, M. D., Northcott, P. A., Korshunov, A., Remke, M., Cho, Y. J., Clifford, S. C., Eberhart, C. G., Parsons, D. W., Rutkowski, S., Gajjar, A., *et al.* (2012). Molecular subgroups of medulloblastoma: the current consensus. *Acta Neuropathol* 123, 465-472.

Thompson, M. C., Fuller, C., Hogg, T. L., Dalton, J., Finkelstein, D., Lau, C. C., Chintagumpala, M., Adesina, A., Ashley, D. M., Kellie, S. J., *et al.* (2006). Genomics identifies medulloblastoma subgroups that are enriched for specific genetic alterations. *J Clin Oncol* 24, 1924-1931.

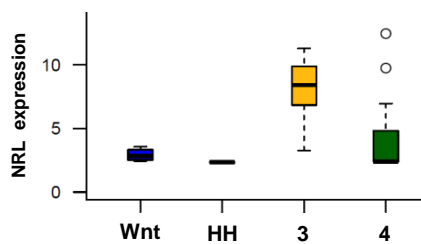
Wang, J., Emadali, A., Le Bescont, A., Callanan, M., Rousseaux, S., and Khochbin, S. (2011). Induced malignant genome reprogramming in somatic cells by testis-specific factors. *Biochim Biophys Acta* 1809, 221-225.

Figure

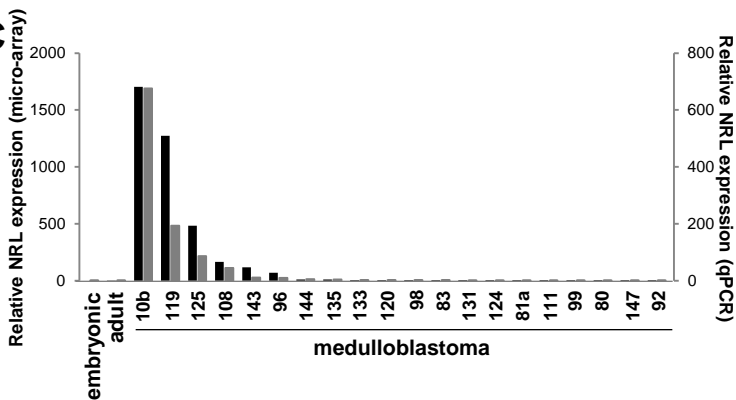
A



B



C



D

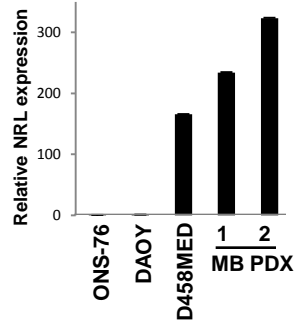


Figure 1 Garancher et al.

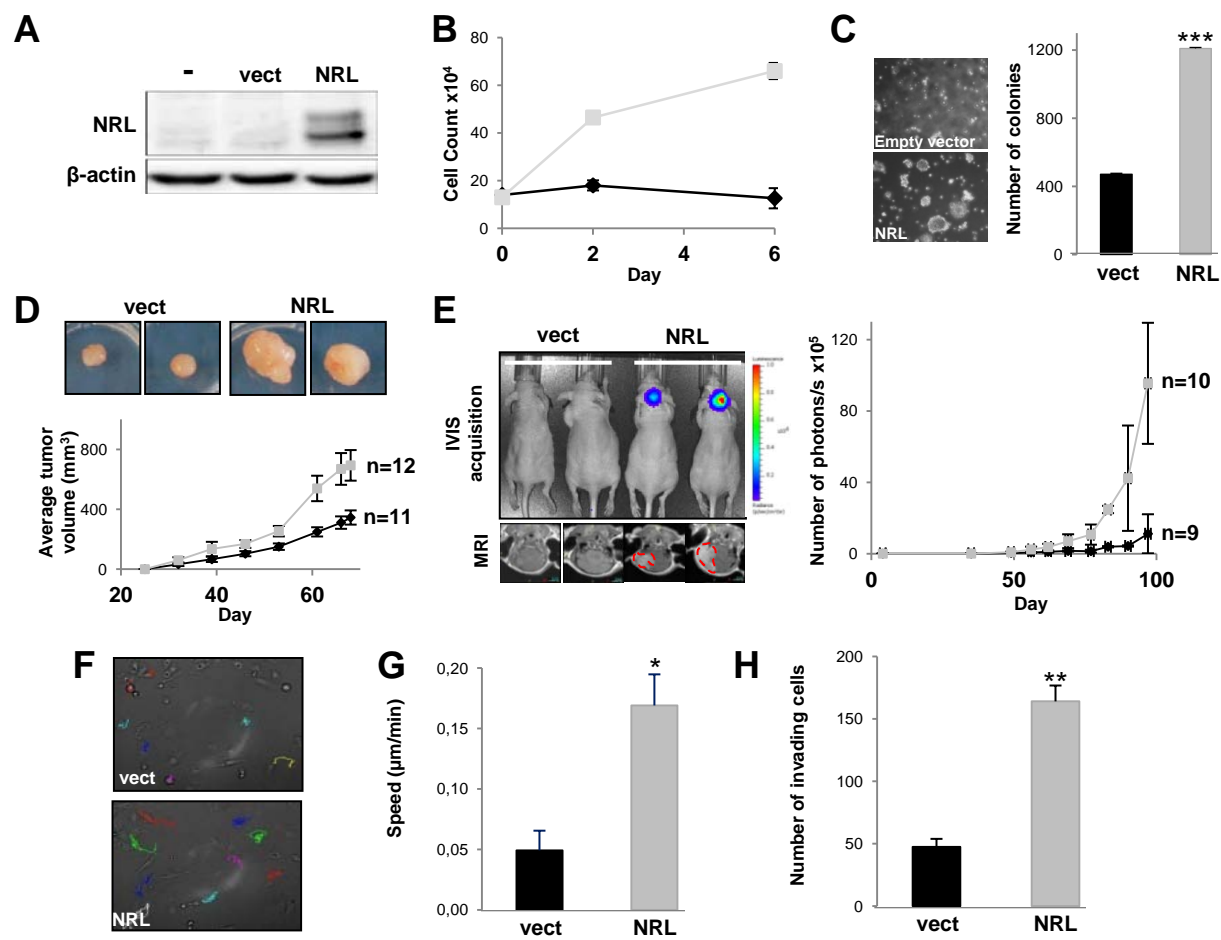


Figure 2 Garancher et al.

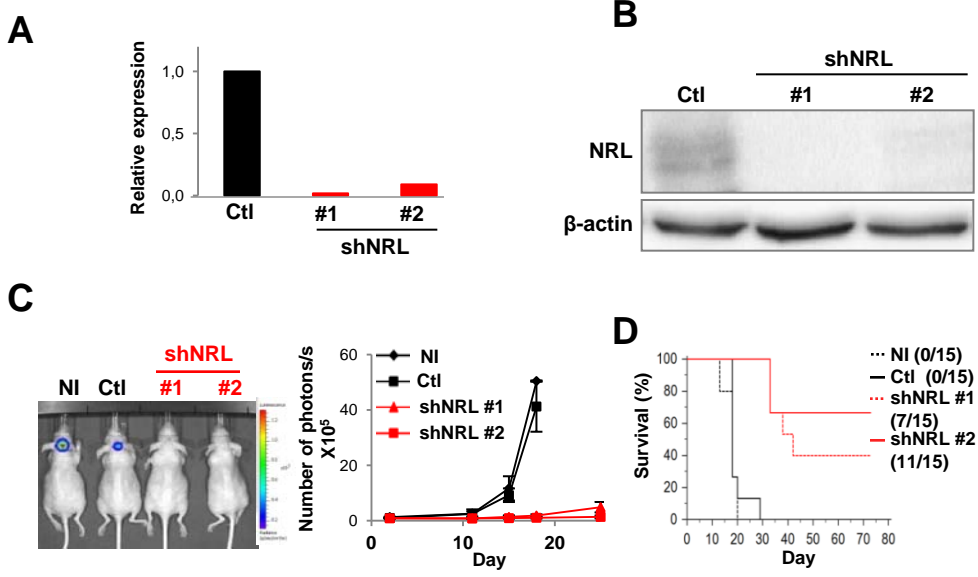


Figure 3 Garancher et al.

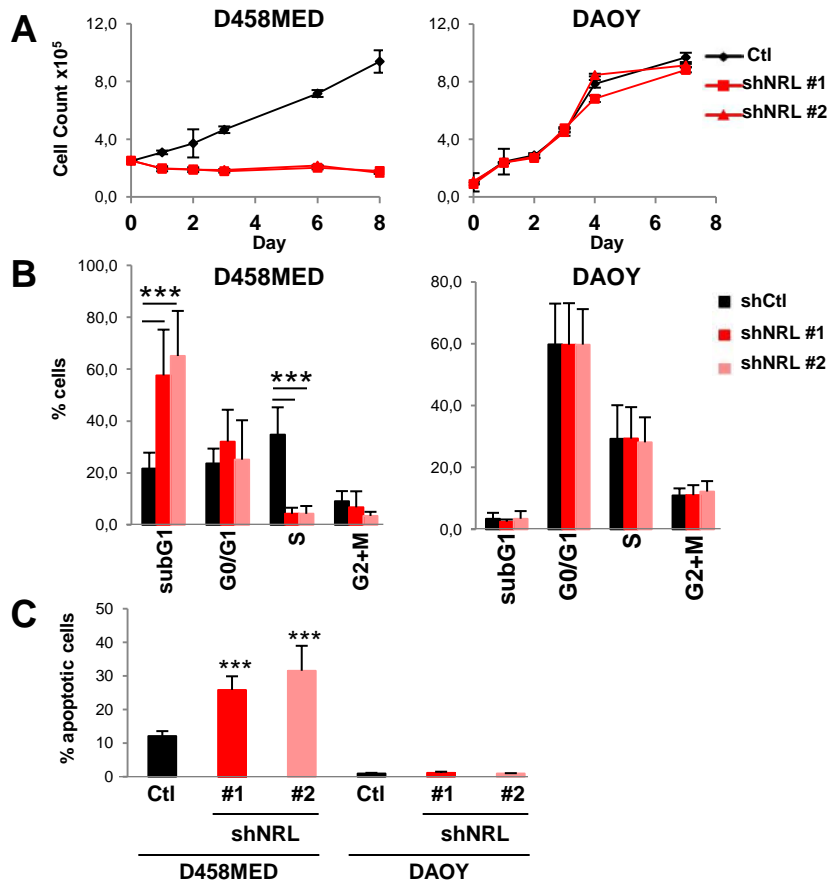


Figure 4 Garancher et al.

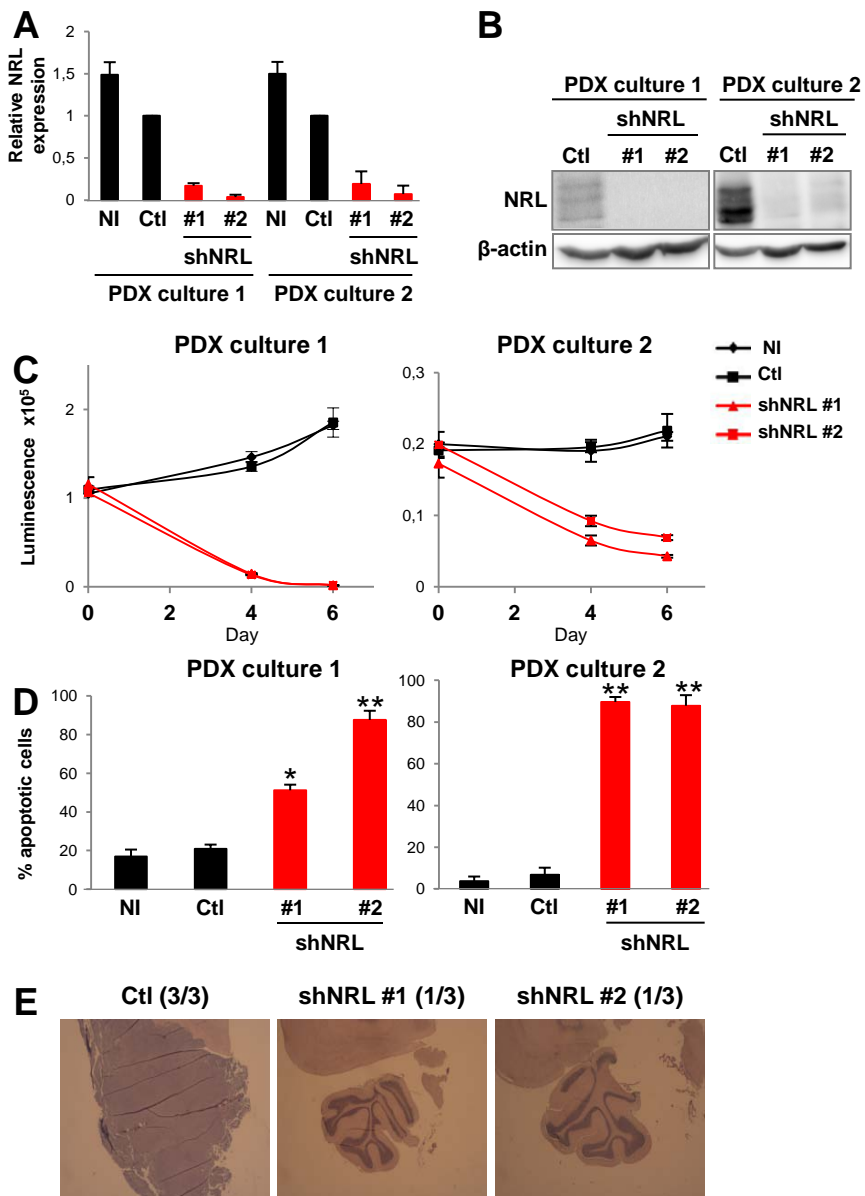


Figure 5 Garancher et al.

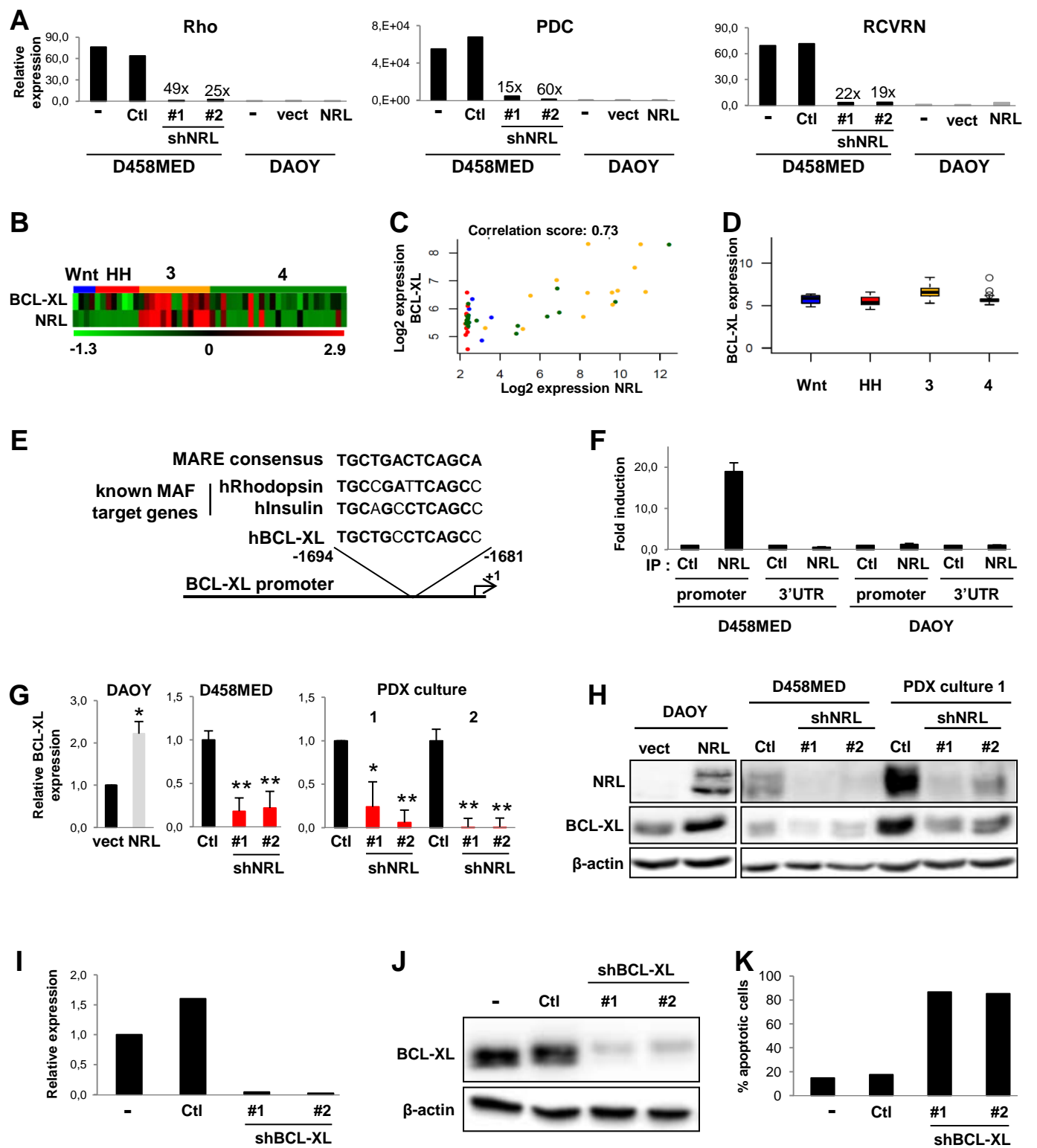


Figure 6 Garancher et al.

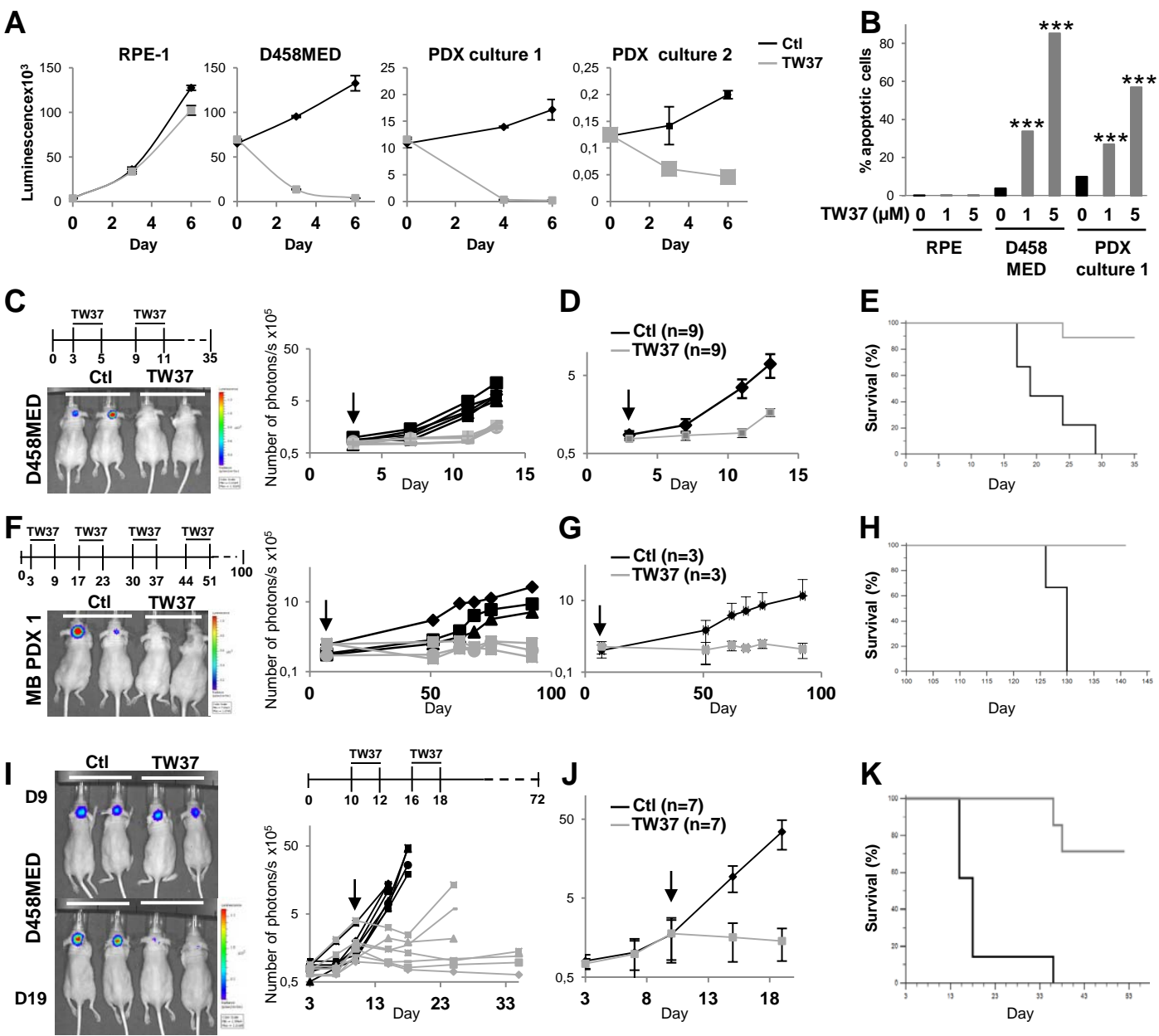


Figure 7 Garancher et al.

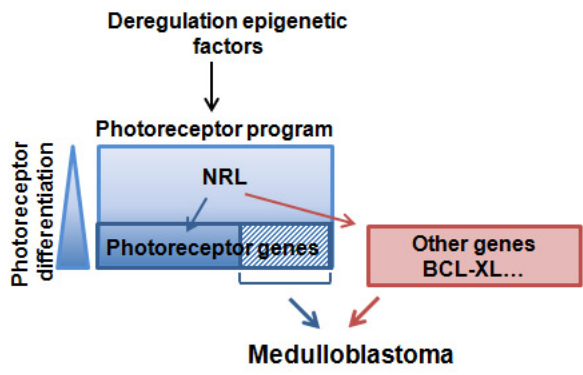
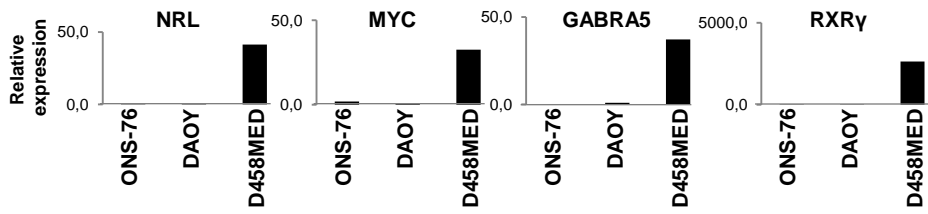
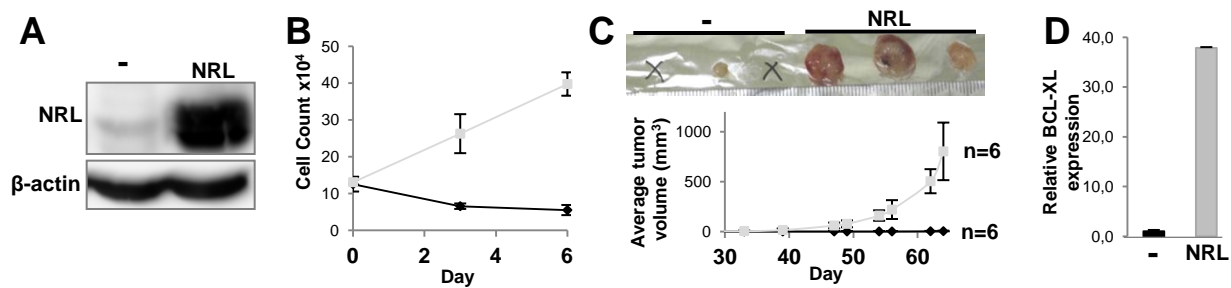


Figure 8 Garancher et al.



Supplemental Figure S1 Garancher et al.



Supplemental Figure S2 Garancher et al.

Supplemental Figure Legends :

Supplemental Figure S1 : The D458MED cell line expresses genes of the group3 MB.

RT-qPCR analysis of the relative expression of NRL, MYC, GABRA5, RXR γ in 3 MB cell lines (DAOY, ONS-76 and D458MED). Expression was normalized to TBP and arbitrarily set to 1 in DAOY. High levels of expression were found for these 4 genes in D458MED but not in ONS-76 and DAOY.

Supplemental Figure S2 : NRL overexpression increases the transformed phenotype of the ONS-76 MB cell line.

ONS-76 were stably transfected by control vector alone (-, in black) or by NRL encoding vector (NRL, in grey). (A) WB showing the ectopic NRL expression in ONS-76. (B) NRL overexpression increases ONS-76 cell proliferation in low serum conditions (0.2% FCS). Growth curve was obtained by counting cells at regular intervals. (C) Ectopic NRL expression increased ONS-76 tumorigenicity upon subcutaneous injection (n=6 for each group). Cells were injected in the right flank of the mouse and tumor growth was determined by measuring tumor size. Photographs of representative tumors are shown (top) and tumor volume over time is represented on the graph (bottom). (D) RT-qPCR showing that NRL overexpression increased BCL-XL expression. Expression was normalized to TBP and was set arbitrary to 1 in control condition (-).

Supplemental Table

Supplemental Table S1

Sequences of oligonucleotides used in qPCR experiments		
<i>Gene</i>	<i>Forward primer 5'-3'</i>	<i>Reverse primer 5'-3'</i>
<i>NRL</i>	GAAGCTGTGCCTTCTGGTT	AAAGCCATTCTGGGACTGAG
<i>Bcl-xL</i>	CCAAGGCTCTAGGTGGTCAT	CAAGCATGCTCAGACCTTCA
<i>Rho</i>	CACCAGCACCTCTACACCT	TTACACACCACCACGTACCG
<i>PDC</i>	TGAGCTGGAAACTGGAAAGC	CTGCTGCAAGGCATGTAAA
<i>RCVRN</i>	CTGCCACTCTCCTCACTC	AGCTCCTCCTCCGAGAACTT
<i>TBP</i>	CACGAACCACGGCACTGATT	TTTTCTTGCTGCCAGTCTGGAC
<i>P-BCL-XL</i>	TCCTGTAAGCGAGTCTGCTG	TGGTGAAACCCCGTCTCTAC
<i>3'UTR-BCL-XL</i>	CATCCCTACCCCTAAGAGC	GCTTCTGGAGGACATTGGA

DISCUSSION

Les facteurs de transcription de la famille MAF, se caractérisent par une dualité fonctionnelle. Bien qu'impliqués dans des processus de différenciation terminale, ce sont aussi des oncogènes établis dans des contextes cellulaires et nutritifs particuliers (Pouponnot et al. 2006). *In vitro*, l'activité transformante des MAF est régulée par phosphorylation par la kinase GSK3. Il existe une forte homologie entre les protéines MAF. Les sites de phosphorylation par GSK3 mis en évidence pour la protéine MAFA sont conservés chez les autres membres. Cela suggère que les MAF pourraient avoir en commun ce mode de régulation par phosphorylation. Il a été montré que les facteurs de transcription MAF exercent un rôle pro-oncogénique à travers la régulation de l'expression de gènes cibles communs (Eychène, Rocques, et Pouponnot 2008).

Les membres de la famille MAF : c-MAF, MAFA et MAFB sont impliqués dans des tumeurs humaines. La surexpression de ces protéines par translocation est causative d'un groupe de myélome multiple (MM) résistants au Velcade[®] (Bortézomib), un inhibiteur du protéasome utilisé, actuellement en clinique dans le traitement du MM. La première partie du travail (Herath et al. 2014) montre que, dans le MM, l'activité oncogénique de c-MAF et MAFB est régulée par phosphorylation par la kinase GSK3. En effet, l'inhibition de la phosphorylation de ces deux protéines MAF, conduit à une altération des propriétés de cellules transformées de MM. Notre étude propose l'utilisation d'inhibiteurs de GSK3 dans le traitement de MM résistants et surexprimant les MAF.

Jusqu'à aujourd'hui, aucun rôle oncogénique n'avait été établi pour NRL. Il est surexprimé dans les médulloblastomes (MB) agressifs et résistants aux thérapies classiques. Ces MB se caractérisent par l'expression d'une marque aberrante de différenciation de type photorécepteur, dont NRL, un facteur clé de ce programme. La deuxième partie du travail a permis d'identifier pour la première fois que NRL est un oncogène, au même titre que les autres membres de la famille MAF. NRL protège les cellules de MB de l'apoptose, en contrôlant l'expression du gène anti-apoptotique BCL-XL, qui pourrait constituer une cible thérapeutique potentielle de ces MB de mauvais pronostics.

L'ensemble de ce travail confirme l'existence d'une dualité fonctionnelle, pro- et anti-oncogénique des quatre grands membres de la famille MAF : c-MAF, MAFB, MAFA et NRL, dépendante du contexte où ils sont exprimés. Alors que dans le MM, la translocation des gènes *c-MAF*, *MAFA* et *MAFB* est à l'origine de leur surexpression, aucune mutation de

NRL n'a été identifiée dans le MB. Dans la première partie de la discussion, nous tenterons d'apporter des éléments qui permettraient d'expliquer pourquoi NRL est exprimé dans ces tumeurs. La mise en relation des différents résultats et de la forte homologie existante entre les gènes MAF suggèrent que les protéines MAF contribueraient de façon similaire au phénotype tumoral, à travers la régulation de gènes cibles communs et des modes de régulations post-traductionnelles identiques, notamment en coopérant avec c-MYC. L'idée d'un rôle similaire des MAF dans les tumeurs sera traitée dans une seconde partie. Enfin, nous nous attarderons sur l'utilisation d'inhibiteurs de la famille des protéines anti-apoptotiques BCL, comme une nouvelle stratégie thérapeutique dans les cancers où les protéines MAF exercent une activité oncogénique. Notons que ces tumeurs sont fréquemment de mauvais pronostic et résistantes aux thérapies.

1. Expression du facteur de transcription spécifique des photorécepteurs NRL dans le MB de groupe 3

Le groupe 3 de MB est caractérisé par des gènes connus pour être exprimés dans les photorécepteurs (« programme photorécepteur »). L'un des acteurs clés de ce programme est le facteur de transcription NRL. Notre travail a montré d'une part que NRL est un oncogène et d'autre part qu'il participe en partie à l'expression de ce programme. NRL n'est pas exprimé de manière physiologique dans le développement du cervelet. A la différence des autres MAF (MAFA, c-MAF et MAFB) dans les MM, aucune altération de NRL n'a été identifiée dans le MB. Néanmoins l'identification des différentes mutations retrouvées dans les MB de groupe 3 apporte des pistes pour expliquer l'expression ectopique de NRL dans ces tumeurs.

1.1. Régulation de l'expression de NRL dans le MB

1.1.1. Implication des facteurs OTX2, CRX et ROR β

Afin de mieux comprendre comment NRL est surexprimée dans le MB, il apparaît intéressant mettre en parallèle les altérations trouvées dans le MB avec la régulation physiologique de l'expression de NRL dans la rétine. Des études réalisées chez la souris ont montré que l'expression de NRL dans les photorécepteurs est sous le contrôle de trois facteurs de

transcription : orthodenticle homeobox 2 (OTX2), cone-rod homeobox (CRX), RAR-related orphan receptor β (ROR β). *OTX2* est surexprimé dans environ 60% des MB. Bien que la surexpression d'*OTX2* ne soit pas exclusive au groupe 3, des translocations de ce gène ont été identifiées uniquement dans ce groupe. Par ailleurs, il est admis que *OTX2* est un oncogène dans le MB. Les facteurs ROR β et ROR α , normalement exprimés respectivement dans la rétine et dans le cervelet, sont tous les deux présents dans des MB de groupe 3. Ils seraient fonctionnellement redondants. Concernant le facteur CRX, les interrogations sont les mêmes que pour la surexpression de *NRL*. En effet, CRX est exprimé de manière très restreinte. Son expression est limitée à la rétine et à la glande pinéale. Dans la rétine, l'expression de CRX est dans un premier temps induite par *OTX2*, puis dans un second temps CRX et ROR coopèrent pour favoriser l'expression de *NRL*. De ce fait, il semble que dans les MB du groupe 3, CRX ne soit pas directement responsable de la surexpression de *NRL*. Considérant ce qui est connu chez la souris, l'expression ectopique de *NRL* dans le groupe 3 de MB pourrait être la conséquence de la surexpression d'*OTX2*, qui en coopérant avec d'autres facteurs, principalement les ROR, induirait l'expression de *NRL*. Néanmoins l'expression des gènes ROR et *OTX2* ne semble pas être suffisante pour expliquer la surexpression de *NRL* dans les MB du groupe 3. En effet ROR et *OTX2* ne sont pas exprimés exclusivement dans les MB du groupe 3 tandis que l'expression de *NRL* est quant à elle restreinte à ce sous-groupe.

1.1.2. Implication de la voie Activine

Les voies de signalisation du TGF β /Activine sont dérégulées dans 20% des MB du groupe 3, suite à des amplifications des gènes codant pour les récepteurs TGFBR1, ACVR2A ou ACVR2B. Ces trois récepteurs activent la même voie de signalisation intracellulaire qui fait intervenir les médiateurs Smad2 et Smad3. A l'inverse des inhibiteurs de la voie sont fréquemment perdus (Northcott, Shih, et al. 2012). Les dérégulations de la voie TGF β /Activine pourraient être à l'origine de la genèse de ces MB de mauvais pronostic. De manière intéressante, la voie de signalisation Activine joue un rôle dans la différenciation des progéniteurs rétiniens en photorécepteurs de type bâtonnet (Davis, Matzuk, et Reh 2000). *NRL* est un facteur clé dans la différenciation de ceux-ci. Récemment une autre étude montre que l'Activine régule l'expression de *NRL* dans une lignée cellulaire de rétinoblastome (Kanno et al. 2009). Néanmoins, il pourrait s'agir d'un mode de régulation indirect, puisqu'il a également été montré que la voie TGF β /Activine par l'activité Smad2/Smad3 est capable

d'induire l'expression du facteur OTX2 dans le développement du système nerveux central (Jia et al. 2009). La surexpression de OTX2 est retrouvée dans tous les MB du groupe 3, et dans uniquement 20% des cas suite à sa translocation. L'ensemble de ces données suggère que dans les MB de groupe 3, l'activation constitutive de la voie TGF β /Activine induirait l'expression de OTX2, qui à son tour pourrait réguler l'expression de NRL.

1.2. Régulation épigénétique de l'expression de NRL

Le groupe 3 de MB présente des dérégulations importantes de facteurs impliqués dans le remodelage de la chromatine, avec des conséquences possibles sur l'expression des gènes. Il est donc envisageable que l'inhibition normale de l'expression de NRL, éteint de manière épigénétique au cours du développement normal, soit levée dans la cellule d'origine du MB de groupe 3, en conséquence de ces dérégulations. Plusieurs protéines connues pour leur rôle dans le remodelage de la chromatine pourraient intervenir en levant cette inhibition et permettre ainsi l'action des protéines OTX2 et ROR.

1.2.1. La protéine SMARCA4

La protéine SMARCA4 est une hélicase possédant une activité ATPase. Elle appartient au complexe multiprotéique SWI (switch mutants)/SNF (sucrose non-fermenting), essentiel au remodelage de la chromatine. En effet celui-ci est recruté au niveau des nucléosomes par des facteurs de transcription. Il participe de façon déterminante à l'activation de gènes normalement réprimés. Des mutations non sens de SMARCA4 sont retrouvées dans environ 10% des MB de groupe 3. Dans ces MB, SMARCA4 mutée ne pourrait plus lever les marques épigénétiques répressives de certains gènes, par exemple des gènes impliqués dans la répression de la transcription de NRL.

1.2.2. Altération du niveau d'acétylation des histones

L'état de compaction de la chromatine détermine l'accessibilité des facteurs de transcription au promoteur de leur gène d'intérêt. L'acétylation des histones est l'une des modifications post-traductionnelles affectant la structure de la chromatine. Le niveau d'acétylation est contrôlé par deux types d'enzymes aux activités opposées : les Histones Acétyl-Transférases (HAT) et Histones Déacétylases (HDAC). Les HAT, en ajoutant des groupements acétyl induisent un relâchement de la chromatine, permettant l'accessibilité des facteurs de

transcription à leur cible nucléotidique et donc conduisant à l'induction de la transcription des gènes. A l'inverse, les HDAC conduisent à une compaction de la chromatine, ayant pour conséquence une répression de la transcription. Cependant, il semble que la régulation de la transcription par acétylation des histones ne soit pas aussi tranchée, mais qu'elle résulte d'une régulation du niveau d'acétylation par les HAT et HDAC. Une étude a notamment montré que l'expression de gènes spécifiques d'un sous-type de photorécepteur, les bâtonnets, nécessite l'activité des HDAC. Le facteur de transcription NRL appartient à ce groupe de gènes, dont l'expression est régulée positivement par les HDAC (B. Chen et Cepko 2007). Par ailleurs, il a été proposé que l'expression des HDAC 5 et 9 pourrait constituer un marqueur de MB de mauvais pronostic, comprenant les MB de groupe 3 (Milde et al. 2010). Au vue de ces observations, nous pouvons émettre l'hypothèse que les HDAC contribueraient à l'expression de NRL dans ces tumeurs, en agissant soit directement au niveau de son promoteur, soit plus probablement en réprimant l'expression de facteurs répresseurs de l'expression de NRL. L'absence de ces facteurs répresseurs aurait pour conséquence la levée de l'inhibition de la transcription de NRL.

1.2.3. Altération du niveau de méthylation

Le statut de méthylation des histones détermine également l'état de compaction de la chromatine. Ce processus peut être associé à une répression ou une activation transcriptionnelle. Le statut de méthylation des histones est régulé par les histones méthyltransférases (HMT) et les histones déméthyltransférases (HDMT). Des dérégulations du profil de méthylation sont trouvées dans les MB suite à des mutations, de gain ou de perte des HMT et HDMT. Environ 6% des MB de groupe 3 présentent des mutations délétères de MLL2. Or MLL2 est une HMT spécifique de la triméthylation de la lysine 4 de l'histone H3 (H3K4), une marque de transcription active (Parsons et al. 2011b). Néanmoins les mutations homozygotes de MLL2 sont rares dans le MB, ce qui suggère que les tumeurs sont dépendantes de la méthylation de H3K4 (Dubuc et al. 2013). D'autre part, une forte proportion de MB appartenant aux groupes 3 et 4 présente une triméthylation de la lysine 27 de l'histone H3 (H3K27me3), entraînant une répression de la transcription. Plus spécifiquement dans le troisième groupe de MB, l'enrichissement en H3K27me3 s'expliquerait en partie par le gain du chromosome 7q, qui porte l'un des gènes de la famille polycomb, EZH2. Ce gène code pour une HMT responsable de la triméthylation de H3K27. Une étude récente dans une lignée de MB de groupe 3 montre que l'extinction du facteur de

transcription OTX2 induirait une diminution de l'expression d'HMT particulière, dont la protéine méthyltransférase EZH2 et une augmentation de celle des HDMT. Cela a pour conséquence la diminution du niveau de méthylation de H3K27 spécifiquement sur les promoteurs connus pour lier OTX2. Il est suggéré qu'OTX2 permettrait le maintien d'un état intermédiaire du niveau de méthylation de H3K27, pourtant connu pour être une marque répressive, au niveau des promoteurs de ces gènes cibles dans le MB (Bunt et al. 2013).

La combinaison des altérations des protéines impliquées dans le remodelage de la chromatine, trouvées dans les MB de groupe 3, pourrait être à l'origine de l'expression de NRL, normalement réprimé dans le cervelet. Il serait en outre intéressant de comparer les profils de méthylation/d'acétylation des histones, de la méthylation de l'ADN au niveau du promoteur de NRL dans les photorécepteurs, le cervelet normal et les MB et de déterminer s'ils sont en faveur d'une transcription active de NRL dans le MB de groupe 3. Les modifications épigénétiques aberrantes trouvées dans les MB de groupe 3 seraient en faveur d'un état permissif de la transcription, qui permettrait à OTX2 d'induire l'expression de NRL. La dérégulation de ces marques épigénétiques pourrait également constituer des cibles thérapeutiques potentielles.

En conclusion, la surexpression de NRL dans les MB de groupe 3 pourrait s'expliquer par les dérégulations des marques épigénétiques et la surexpression du facteur de transcription OTX2 (Figure 21). En effet, l'état répressif du promoteur de NRL serait levé suite aux dérégulations des marques épigénétiques. NRL placé dans un état permissif, les protéines OTX2 et ROR pourraient intervenir pour activer l'expression de NRL. La surexpression d'OTX2 est due soit à sa translocation, soit à des dérégulations de la voie TGF β /Activine dans les MB de groupe 3. OTX2 pourrait alors réguler l'expression de NRL directement en tant que facteur de transcription ou indirectement à travers la régulation de facteurs épigénétiques.

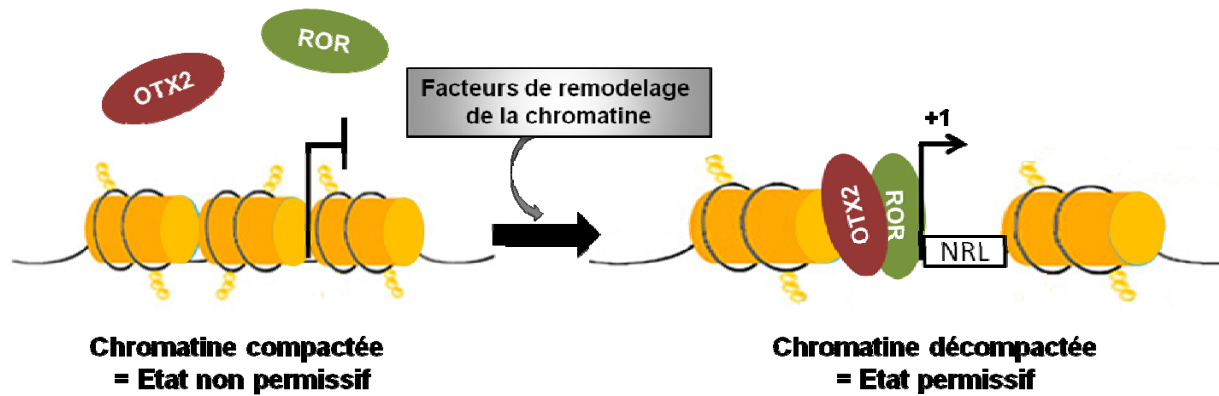


FIGURE 21 : REGULATION HYPOTHETIQUE DE L'EXPRESSION DE NRL DANS LE MB

Dans les MB de groupe 3, les facteurs de transcription ROR et OTX2 induiraient l'expression de NRL, après intervention de facteurs de remodelage de la chromatine.

2. Activité oncogénique de c-MAF et NRL respectivement dans le myélome multiple et le médulloblastome.

2.1. *Le facteur de transcription NRL est un oncogène atypique*

Dans la rétine, NRL régule l'expression d'un certain nombre de gènes spécifiques d'un sous-type de photorécepteurs, les bâtonnets. Une partie de ces gènes est retrouvée surexprimée dans les MB de groupe 3. Nos données indiquent que NRL serait en partie responsable de l'expression de ce programme photorécepteur. En effet l'extinction de l'expression de NRL s'accompagne d'une diminution drastique de l'expression de certains gènes de ce programme. Dans la rétine NRL coopère notamment avec CRX, afin d'activer l'expression de gènes cibles, par exemple la rhodopsine dans les photorécepteurs matures. CRX étant également exprimé dans ces tumeurs, la présence du programme photorécepteur pourrait ainsi s'expliquer par la coopération des protéines NRL et CRX dans les MB de groupe 3. Bien que le programme photorécepteur ne soit pas induit dans nos deux modèles gain de fonction, NRL y exerce un rôle oncogénique. Son pouvoir transformant serait donc, au moins en partie indépendant du programme photorécepteur. Il n'est néanmoins pas exclu que certains gènes de ce programme participent à la carcinogenèse du MB. Il serait intéressant de co-exprimer CRX et NRL dans les cellules de MB et de déterminer si l'association de ces deux facteurs induit le programme photorécepteur et si la transformation cellulaire en est augmentée

comparée à l'expression de NRL seule. Cela indiquerait que d'autres gènes de ce programme sont importants dans la carcinogenèse du groupe 3 de MB. Par ailleurs, l'activité oncogénique de NRL pourrait être également dépendante du contexte cellulaire. Une étude montre que NRL exerce un rôle anti-oncogénique dans une tumeur de la rétine, le rétinoblastome au profit d'une activité pro-différenciatrice (Kanno et al. 2009). Dans le contexte physiologique, NRL est principalement exprimé dans la rétine. Dans cet environnement, il est plutôt considéré comme un gène suppresseur de tumeur. Ce travail apporte la première démonstration que NRL est un oncogène atypique, au même titre que les autres membres de la famille MAF. Selon le contexte, NRL pourrait avoir des activités de suppresseur de tumeur ou d'oncogène.

2.2. L'activité oncogénique des protéines MAF est régulée par des modifications post-traductionnelles

De même que les autres grands membres de la famille MAF, l'activité de NRL pourrait être régulée par des modifications post-traductionnelles, et plus particulièrement par phosphorylation. Ce mode de régulation des MAF interviendrait dans différents processus physiologiques et pathologiques. En effet, les protéines MAF différenciellement phosphorylées interagissent avec divers partenaires et peuvent réguler des gènes cibles différents. Les travaux du laboratoire ont montré que l'activité oncogénique de MAFA, c-MAF et MAFB est régulée par la phosphorylation induite par la kinase GSK3. Nous avons mis en évidence l'importance de ces phosphorylations sur l'activité oncogénique de c-MAF et MAFB dans le myélome multiple. Dans la séquence de *NRL*, les résidus S65, S61 et T57 sont conservés, tandis que le résidu thréonine 53 est quant à lui converti en sérine, un résidu également phosphorylable (Figure 6). Ces homologues suggèrent que l'activité de NRL pourrait également être régulée par phosphorylation dans le médulloblastome. Dans la rétine, la protéine NRL est phosphorylée par les deux kinases JNK1 et MAPK2 (Hernan et al., 2012; Kanda et al., 2007). Ces phosphorylations de NRL sont nécessaires au recrutement de co-facteurs, par exemple Tip60, et à l'activation de la transcription de ses gènes cibles. Par ailleurs, l'identification de mutants de phosphorylation de NRL dans les rétinites pigmentaires est en faveur d'un rôle fonctionnel de ces phosphorylations (Hernan et al. 2012; Kanda et al. 2007).

Le profil de migration de NRL observé par western-blot, dans les lignées de MB suggère qu'il y aurait plusieurs formes phosphorylées. Aucune différence majeure n'est observée dans le profil de migration de NRL suite au traitement de ces cellules par un inhibiteur de GSK3, le chlorure de lithium, suggérant *a contrario* des autres membres de la famille, que la protéine NRL ne serait pas phosphorylée par GSK3. Des résultats préliminaires de l'équipe seraient en faveur d'une régulation de la phosphorylation de NRL par des protéines kinases dépendante des cyclines (CDK). Au même titre que les autres facteurs de transcription MAF, le pouvoir transformant de NRL pourrait être régulé par phosphorylation. Comme nous l'avons montré dans le MM, cibler la phosphorylation de NRL, non pas avec des inhibiteurs de GSK3, mais des drogues ciblant les CDK, pourrait constituer une approche thérapeutique potentielle.

Le pouvoir transformant des protéines MAF peut également être modulé par SUMOylation, une autre modification post-traductionnelle, qui consiste en la liaison d'une protéine SUMO (Small Ubiquitin-like MOdifier) sur une lysine acceptrice. La SUMOylation des MAF sur des résidus lysine conservés régule leur activité transcriptionnelle (Roger et al. 2010; Shao et Cobb 2009; Tillmanns et al. 2007). Une étude récente a notamment montré que la SUMOylation de MAFA réduit son pouvoir transformant (Kanai et al. 2010). De manière surprenante la SUMOylation de NRL sur les mêmes résidus que MAFA, augmente l'activité transactivatrice de NRL. Bien que la SUMOylation du facteur de transcription NRL n'ait pas été mise en évidence *in vivo*, *in vitro* elle favorise l'expression de certains de ses gènes cibles. En effet, l'utilisation d'un mutant non SUMOylable de NRL a permis de mettre en évidence une diminution de l'expression de deux de ses gènes cibles, la rhodopsine et NR2E3, comparée à la forme sauvage. La SUMOylation de NRL pourrait permettre de réguler plus finement l'expression de ses gènes cibles au cours du développement des photorécepteurs (Roger et al. 2010). On peut alors imaginer que la SUMOylation de NRL pourrait également réguler son activité oncogénique.

Ces données mettent en évidence l'importance des régulations post-traductionnelles, telles que les phosphorylations ou la SUMOylation des protéines MAF pour leur activité oncogénique.

2.3. *Coopération de l'oncogène MYC et des protéines MAF dans les cancers*

Il est admis que les oncogènes MAF jouent un rôle actif dans la tumorigenèse. Dans le MM, ils contrôlent la progression du cycle cellulaire par l'intermédiaire de l'induction du gène de la CYCLINE-D2 (CCND2) (Hurt et al. 2004). CCND2 participe en effet activement à la transition G1/S. Sa surexpression permet de lever un blocage en phase G1 induit par la protéine RB (Ando, Ajchenbaum-Cymbalista, et Griffin 1993). Dans le MB, les expériences d'immunoprécipitation de chromatine que nous avons réalisées montrent que NRL induit également l'expression de CCND2 (résultats non montrés). Par ailleurs, la perte de NRL dans nos expériences par shARN conduit à un blocage des cellules en phase G1, suggérant que le rôle de NRL dans le MB ne serait pas limité à une protection des cellules contre l'apoptose. D'autre part, les protéines MAF permettent une meilleure interaction entre les cellules cancéreuses et les cellules stromales de la moelle, en induisant l'expression d'un gène d'adhésion, l'INTEGRINE- β 7. L'interaction cellule-cellule induit l'expression de cytokines pro-angiogéniques, favorisant un environnement tumoral adéquat (Hurt et al. 2004). Enfin les protéines MAF sont associées à des tumeurs agressives. A travers l'induction de l'expression d'ARK5, elles participent également aux processus métastatiques, en favorisant l'invasion des cellules tumorales (A. Suzuki et al. 2005).

Mon travail a permis d'identifier le gène *BCL-XL*, un membre de la famille des anti-apoptotiques BCL, comme un nouveau gène cible du facteur de transcription NRL. Dans les conditions physiologiques, *BCL-XL* n'a jamais été identifié comme un gène cible de NRL, ni des autres protéines MAF. De la même manière que les autres MAF, l'activité oncogénique de NRL ne serait donc pas couplée à son rôle physiologique. L'oncogène *NRL* protégerait de l'apoptose les cellules tumorales de MB, à travers l'induction de l'expression de *BCL-XL* (Figure 22). Bien que l'activité oncogénique des MAF ne soit pas à ce jour associée à des processus anti-apoptotiques, cela pourrait néanmoins constituer un nouveau rôle des MAF dans la carcinogenèse. Une étude récente montre que *BCL-XL* est surexprimé spécifiquement dans un sous-groupe de MM qui surexprime les MAF (Gomez-Bougie et Amiot 2013). Ces données suggèrent que les MAF pourraient alors également protéger le MM de l'apoptose en induisant l'expression de *BCL-XL*.

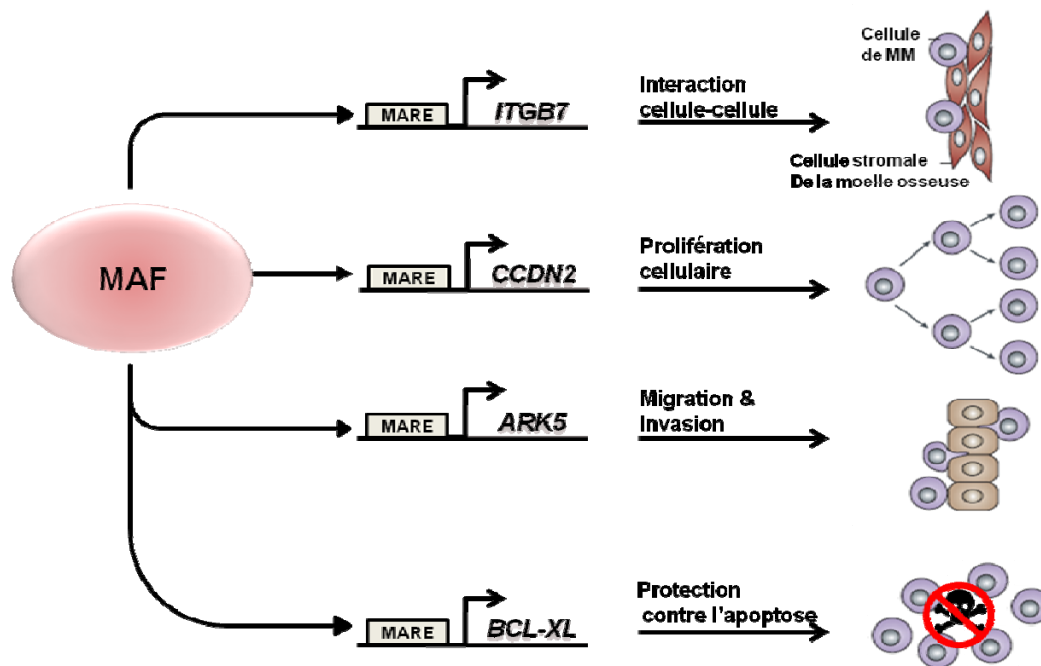


FIGURE 22 : NOUVEAU MODELE DU ROLE DES PROTEINES MAF DANS LES CANCERS

(cf Figure 5) (Adapté de Eychène, Rocques, et Pouponnot 2008) Les grands membres de la famille MAF seraient également impliqués dans les cancers en régulant l'expression de gènes anti-apoptotiques (BCL-XL).

A l'instar de ce qui est observé dans le MB, les MM qui expriment les protéines MAF montrent également une surexpression de MYC (Chesi et Bergsagel 2013). L'association des protéines MAF et de MYC ne semble donc pas restreinte au MB. Grâce à leur capacité à protéger les cellules tumorales de l'apoptose, les protéines MAF pourraient en effet coopérer avec MYC dans la transformation cellulaire. Bien que MYC soit un oncogène puissant, il est également inducteur d'apoptose (Pelengaris, Khan, et Evan 2002). L'échappement des cellules tumorales à l'apoptose induite par MYC est nécessaire pour qu'il exerce son pouvoir transformant. Différentes études montrent une synergie entre BCL-XL et MYC dans les tumeurs, comme par exemple dans le lymphome (P. N. Kelly et al. 2011) et les leucémies lymphoïdes aiguës (Swanson et al. 2004). Par ailleurs, une autre étude montre que la co-expression de MYC et BCL-XL dans les cellules B de souris induit la formation de néoplasmes plus précoces et plus agressifs que ceux induit par la surexpression seule de MYC. Ces tumeurs récapitulent certaines caractéristiques du myélome multiple (Cheung et al. 2004).

En conclusion, ces données suggèrent que les protéines MAF, par la régulation de BCL-XL, seraient des partenaires préférentiels de c-MYC dans des tumeurs agressives et de mauvais pronostics en levant l'activité pro-apoptotique de c-MYC.

3. Les protéines anti-apoptotiques BCL, de nouvelles cibles dans le traitement de tumeurs résistantes

Les facteurs de transcription MAF sont associés à des tumeurs agressives et résistantes aux traitements classiques. Les protéines c-MAF, MAFB et MAFA sont exprimées dans des myélomes multiples résistants au bortézomib, un inhibiteur du protéasome. Notre étude montre que le bortézomib stabilise la forme phosphorylée des MAF, et ainsi favoriserait leur activité oncogénique. Cela nous a conduit à proposer une nouvelle cible thérapeutique, la kinase GSK3, responsable de cette phosphorylation. Si l'on considère que les MAF régulent l'expression de BCL-XL, le mécanisme de résistance au bortézomib serait en partie dû à la régulation de BCL-XL par les MAF. Une étude a notamment montré *in vitro* et *in vivo* que la combinaison du bortézomib avec un inhibiteur pan-BCL réduit davantage la tumorigénèse de cellules de MM, comparé à un traitement au bortézomib seul (Trudel et al. 2007). Ces données suggèrent que des inhibiteurs de la famille des anti-apoptotiques BCL sensibiliseraient les MM au bortézomib. La protéine NRL est quant à elle associée à des MB de mauvais pronostics et également résistants aux thérapies qui associent la chirurgie, la chimiothérapie et la radiothérapie. Dans les cas où les patients survivent, les effets secondaires à long terme sont dramatiques. Notre travail, portant sur les MB de groupe 3, établit que des stratégies visant à inhiber les protéines anti-apoptotiques BCL, constitueraient une thérapie efficace. En effet, l'extinction de BCL-XL induit une apoptose massive des cellules. Ce même effet est observé *in vitro* suite au traitement des cellules par un inhibiteur des BCL, le TW37. *In vivo*, le TW37 prévient d'une part la croissance tumorale et d'autre part induit une régression des tumeurs préexistantes au niveau du cervelet. L'utilisation en simple agent inhibiteur de BCL est efficace dans nos modèles. Néanmoins la combinaison de tels inhibiteurs et des traitements classiques serait donc plus encore au bénéfice du patient. En effet, il a été montré un synergisme des thérapies ciblant les BCL et d'agents génotoxiques. La combinaison d'inhibiteurs de BCL et de doses plus faibles de chimiothérapies classiques et/ou de radiothérapie conduirait à un meilleur taux de guérison et une diminution des effets

secondaires à long terme. Il faut noter cependant que le TW37 n'inhibe pas uniquement BCL-XL, mais également MCL-1 et BCL2, deux autres membres anti-apoptotiques de la famille BCL. L'inhibition d'un des membres BCL pourrait être compensée par une surexpression des deux autres et expliquerait ainsi l'échec de l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de l'une ou l'autre des BCL. Des stratégies thérapeutiques ciblant les protéines anti-apoptotiques BCL sont à envisager pour des tumeurs qui surexpriment les MAF. L'apoptose est un processus essentiel au développement normal. Un blocage de l'apoptose favorise la carcinogenèse, mais *a contrario* une apoptose aberrante conduit à d'autres pathologies, comme par exemple des maladies neurodégénératives. Bien qu'aucun signe de toxicité ne soit observé chez les souris traitées avec des inhibiteurs des protéines anti-apoptotiques BCL, il nous faut être prudent et déterminer la toxicité dans les tissus sains chez l'Homme. Il a été proposé que les cellules tumorales soient plus sensibles à l'inhibition de l'apoptose que les cellules saines du fait des aberrations qu'elles présentent (John C Reed 2003). Les essais cliniques actuellement en cours révèlent que l'un des principaux effets secondaires est une thrombopénie, et de fait une augmentation du risque hémorragique. Les processus apoptotiques étant par ailleurs régulés au cours du développement, l'utilisation de telles drogues pourrait s'avérer trop toxique chez des enfants dont la croissance n'est pas terminée. Ainsi, les effets secondaires dus aux inhibiteurs des protéines anti-apoptotiques BCL pourraient s'avérer trop sévères pour être utilisés dans le traitement de MB, une tumeur pédiatrique.

Conclusion générale

Les facteurs de transcription MAF sont exprimés dans des tumeurs agressives, de mauvais pronostics et résistantes aux thérapies classiques, qu'il s'agisse de NRL dans le médulloblastome ou bien c-MAF, MAFB et MAFA dans le myélome multiple. Alors que c-MAF, MAFB et MAFA sont des oncogènes établis, mon travail a permis de mettre en évidence un rôle oncogénique pour le facteur de transcription NRL spécifique des photorécepteurs, et révélé l'importance du programme photorécepteur, considéré jusque là comme une marque aberrante de différenciation. L'étude de l'activité oncogénique des MAF, de part leur régulation post-traductionnelle et l'identification de leurs gènes cibles, nous a permis de proposer de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles dans des tumeurs résistantes.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abdouh, Mohamed, Sabrina Facchino, Wassim Chatoo, Vijayabalan Balasingam, José Ferreira, et Gilbert Bernier. 2009. « BMI1 Sustains Human Glioblastoma Multiforme Stem Cell Renewal ». *The Journal of Neuroscience* 29 (28): 8884-8896. doi:10.1523/JNEUROSCI.0968-09.2009.
- Adams, Jacqui, Darren Cuthbert-Heavens, Sylvia Bass, et Margaret A. Knowles. 2005. « Infrequent mutation of TRAIL receptor 2 (TRAIL-R2/DR5) in transitional cell carcinoma of the bladder with 8p21 loss of heterozygosity ». *Cancer Letters* 220 (2): 137-144. doi:10.1016/j.canlet.2004.06.052.
- Aguayo-Mazzucato, C, A Koh, I El Khattabi, W-C Li, E Toschi, A Jermendy, K Juhl, et al. 2011. « MafA Expression Enhances Glucose-Responsive Insulin Secretion in Neonatal Rat Beta Cells ». *Diabetologia* 54 (3): 583-593. doi:10.1007/s00125-010-2026-z.
- Akao, Y, Y Otsuki, S Kataoka, Y Ito, et Y Tsujimoto. 1994. « Multiple Subcellular Localization of Bcl-2: Detection in Nuclear Outer Membrane, Endoplasmic Reticulum Membrane, and Mitochondrial Membranes ». *Cancer Research* 54 (9): 2468-2471.
- Akimoto, Masayuki, Hong Cheng, Dongxiao Zhu, Joseph A Brzezinski, Ritu Khanna, Elena Filippova, Edwin C T Oh, et al. 2006. « Targeting of GFP to Newborn Rods by Nrl Promoter and Temporal Expression Profiling of Flow-Sorted Photoreceptors ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (10): 3890-3895. doi:10.1073/pnas.0508214103.
- Ando, K, F Ajchenbaum-Cymbalista, et J D Griffin. 1993. « Regulation of G1/S Transition by Cyclins D2 and D3 in Hematopoietic Cells ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90 (20): 9571-9575.
- Artner, Isabella, Bruno Bianchi, Jeffrey C Raum, Min Guo, Tomomi Kaneko, Sabine Cordes, Michael Sieweke, et Roland Stein. 2007. « MafB Is Required for Islet Beta Cell Maturation ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (10): 3853-3858. doi:10.1073/pnas.0700013104.
- Artner, Isabella, Yan Hang, Magdalena Mazur, Tsunehiko Yamamoto, Min Guo, Jill Lindner, Mark A Magnuson, et Roland Stein. 2010. « MafA and MafB Regulate Genes Critical to Beta-Cells in a Unique Temporal Manner ». *Diabetes* 59 (10): 2530-2539. doi:10.2337/db10-0190.
- Ashimori, Naoki, Benjamin D Zeitlin, Zhaocheng Zhang, Kristy Warner, Ilan M Turkienicz, Aaron C Spalding, Theodoros N Teknos, Shaomeng Wang, et Jacques E Nör. 2009. « TW-37, a Small-Molecule Inhibitor of Bcl-2, Mediates S-Phase Cell Cycle Arrest and Suppresses Head and Neck Tumor Angiogenesis ». *Molecular Cancer Therapeutics* 8 (4): 893-903. doi:10.1158/1535-7163.MCT-08-1078.
- Ashkenazi, A, et V M Dixit. 1998. « Death Receptors: Signaling and Modulation ». *Science (New York, N.Y.)* 281 (5381): 1305-1308.
- Aziz, Athar, Erinn Soucie, Sandrine Sarrazin, et Michael H Sieweke. 2009. « MafB/c-Maf Deficiency Enables Self-Renewal of Differentiated Functional Macrophages ». *Science (New York, N.Y.)* 326 (5954): 867-871. doi:10.1126/science.1176056.
- Aziz, Athar, Laurent Vanhille, Peer Mohideen, Louise M Kelly, Claas Otto, Youssef Bakri, Noushine Mossadegh, Sandrine Sarrazin, et Michael H Sieweke. 2006. « Development of Macrophages with Altered Actin Organization in the Absence of MafB ». *Molecular and Cellular Biology* 26 (18): 6808-6818. doi:10.1128/MCB.00245-06.
- Bakhshi, A, J P Jensen, P Goldman, J J Wright, O W McBride, A L Epstein, et S J Korsmeyer. 1985. « Cloning the Chromosomal Breakpoint of t(14;18) Human Lymphomas: Clustering around JH on Chromosome 14 and near a Transcriptional Unit on 18 ». *Cell* 41 (3): 899-906.
- Bandopadhyay, Pratiti, Guillaume Berghold, Brian Nguyen, Simone Schubert, Sharareh Gholamin, Yujie Tang, Sara Bolin, et al. 2014. « BET Bromodomain Inhibition of MYC-Amplified Medulloblastoma ». *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 20 (4): 912-925. doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-2281.

- Barnhart, Bryan C, Justine C Lee, Elizabeth C Alappat, et Marcus E Peter. 2003. « The Death Effector Domain Protein Family ». *Oncogene* 22 (53): 8634-8644. doi:10.1038/sj.onc.1207103.
- Bartlett, F, R Kortmann, et F Saran. 2013. « Medulloblastoma ». *Clinical Oncology (Royal College of Radiologists (Great Britain))* 25 (1): 36-45. doi:10.1016/j.clon.2012.09.008.
- Baryawno, Ninib, Baldur Sveinbjörnsson, Per Kogner, et John Inge Johnsen. 2010. « Medulloblastoma: A Disease with Disorganized Developmental Signaling Cascades ». *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 9 (13): 2548-2554.
- Benkhelifa, S, S Provot, O Lecoq, C Pouponnot, G Calothy, et M P Felder-Schmittbuhl. 1998. « mafA, a Novel Member of the Maf Proto-Oncogene Family, Displays Developmental Regulation and Mitogenic Capacity in Avian Neuroretina Cells ». *Oncogene* 17 (2): 247-254. doi:10.1038/sj.onc.1201898.
- Benkhelifa, S, S Provot, E Nabais, A Eychène, G Calothy, et M P Felder-Schmittbuhl. 2001. « Phosphorylation of MafA Is Essential for Its Transcriptional and Biological Properties ». *Molecular and Cellular Biology* 21 (14): 4441-4452. doi:10.1128/MCB.21.14.4441-4452.2001.
- Bergsagel, P L, et W M Kuehl. 2001. « Chromosome Translocations in Multiple Myeloma ». *Oncogene* 20 (40): 5611-5622. doi:10.1038/sj.onc.1204641.
- Bergsagel, P Leif, María-Victoria Mateos, Norma C Gutierrez, S Vincent Rajkumar, et Jesús F San Miguel. 2013. « Improving Overall Survival and Overcoming Adverse Prognosis in the Treatment of Cytogenetically High-Risk Multiple Myeloma ». *Blood* 121 (6): 884-892. doi:10.1182/blood-2012-05-432203.
- Berman, David M, Sunil S Karhadkar, Andrew R Hallahan, Joel I Pritchard, Charles G Eberhart, D Neil Watkins, James K Chen, et al. 2002. « Medulloblastoma Growth Inhibition by Hedgehog Pathway Blockade ». *Science (New York, N.Y.)* 297 (5586): 1559-1561. doi:10.1126/science.1073733.
- Beroukhim, Rameen, Craig H Mermel, Dale Porter, Guo Wei, Soumya Raychaudhuri, Jerry Donovan, Jordi Barretina, et al. 2010. « The Landscape of Somatic Copy-Number Alteration across Human Cancers ». *Nature* 463 (7283): 899-905. doi:10.1038/nature08822.
- Blanchi, Bruno, Louise M Kelly, Jean-Charles Viemari, Isabelle Lafon, Henri Burnet, Michelle Bévangut, Silke Tillmanns, et al. 2003. « MafB Deficiency Causes Defective Respiratory Rhythmogenesis and Fatal Central Apnea at Birth ». *Nature Neuroscience* 6 (10): 1091-1100. doi:10.1038/nn1129.
- Boersma-Vreugdenhil, Gienke R, Jeroen Kuipers, Esther Van Stralen, Ton Peeters, Lucienne Michaux, Anne Hagemeyer, Peter L Pearson, Hans C Clevers, et Bert J E G Bast. 2004. « The Recurrent Translocation t(14;20)(q32;q12) in Multiple Myeloma Results in Aberrant Expression of MAFB: A Molecular and Genetic Analysis of the Chromosomal Breakpoint ». *British Journal of Haematology* 126 (3): 355-363. doi:10.1111/j.1365-2141.2004.05050.x.
- Bourdeaut, Franck, Catherine Miquel, Wilfrid Richer, Jacques Grill, Michel Zerah, Camille Grison, Gaëlle Pierron, et al. 2014. « Rubinstein-Taybi Syndrome Predisposing to Non-WNT, Non-SHH, Group 3 Medulloblastoma ». *Pediatric Blood & Cancer* 61 (2): 383-386. doi:10.1002/pbc.24765.
- Bourdeaut, Franck, Celio Pouponnot, et Olivier Ayrault. 2012. « [Subtypes of medulloblastomas: distinct cellular origins] ». *Médecine sciences: M/S* 28 (10): 805-809. doi:10.1051/medsci/20122810003.
- Bras, M, B Queenan, et S A Susin. 2005. « Programmed Cell Death via Mitochondria: Different Modes of Dying ». *Biochemistry. Biokhimiia* 70 (2): 231-239.
- Braun, Frédérique, Sophie de Carné Trécesson, Joséphine Bertin-Ciftci, et Philippe Juin. 2013. « Protect and Serve: Bcl-2 Proteins as Guardians and Rulers of Cancer Cell Survival ». *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 12 (18): 2937-2947. doi:10.4161/cc.25972.

- Bredel, Markus, Denise M Scholtens, Ajay K Yadav, Angel A Alvarez, Jaclyn J Renfrow, James P Chandler, Irene L Y Yu, et al. 2011. « NFKBIA Deletion in Glioblastomas ». *The New England Journal of Medicine* 364 (7): 627-637. doi:10.1056/NEJMoa1006312.
- Browd, Samuel R, Anna M Kenney, Oren N Gottfried, Joon Won Yoon, David Walterhouse, Carolyn A Pedone, et Daniel W Fults. 2006. « N-Myc Can Substitute for Insulin-like Growth Factor Signaling in a Mouse Model of Sonic Hedgehog-Induced Medulloblastoma ». *Cancer Research* 66 (5): 2666-2672. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-2198.
- Brugières, Laurence, Gaëlle Pierron, Agnès Chompret, Brigitte Bressac-de Paillerets, Federico Di Rocco, Pascale Varlet, Alain Pierre-Kahn, Olivier Caron, Jacques Grill, et Olivier Delattre. 2010. « Incomplete Penetrance of the Predisposition to Medulloblastoma Associated with Germ-Line SUFU Mutations ». *Journal of Medical Genetics* 47 (2): 142-144. doi:10.1136/jmg.2009.067751.
- Brundage, M E, P Tandon, D W Eaves, J P Williams, S J Miller, R H Hennigan, A Jegga, T P Cripe, et N Ratner. 2014. « MAF Mediates Crosstalk between Ras-MAPK and mTOR Signaling in NF1 ». *Oncogene*, février. doi:10.1038/onc.2013.506.
- Brunskill, Eric W, Kylie Georgas, Bree Rumballe, Melissa H Little, et S Steven Potter. 2011. « Defining the Molecular Character of the Developing and Adult Kidney Podocyte ». *PLoS One* 6 (9): e24640. doi:10.1371/journal.pone.0024640.
- Bunt, Jens, Nancy A Hasselt, Danny A Zwijnenburg, Jan Koster, Rogier Versteeg, et Marcel Kool. 2013. « OTX2 Sustains a Bivalent-like State of OTX2-Bound Promoters in Medulloblastoma by Maintaining Their H3K27me3 Levels ». *Acta Neuropathologica* 125 (3): 385-394. doi:10.1007/s00401-012-1069-2.
- Bunt, Jens, Nancy E Hasselt, Danny A Zwijnenburg, Mohamed Hamdi, Jan Koster, Rogier Versteeg, et Marcel Kool. 2012. « OTX2 Directly Activates Cell Cycle Genes and Inhibits Differentiation in Medulloblastoma Cells ». *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer* 131 (2): E21-32. doi:10.1002/ijc.26474.
- Bunt, Jens, Nancy E Hasselt, Danny A Zwijnenburg, Jan Koster, Rogier Versteeg, et Marcel Kool. 2011. « Joint Binding of OTX2 and MYC in Promotor Regions Is Associated with High Gene Expression in Medulloblastoma ». *PLoS One* 6 (10): e26058. doi:10.1371/journal.pone.0026058.
- Butler, A E, R P Robertson, R Hernandez, A V Matveyenko, T Gurlo, et P C Butler. 2012. « Beta Cell Nuclear Musculoaponeurotic Fibrosarcoma Oncogene Family A (MafA) Is Deficient in Type 2 Diabetes ». *Diabetologia* 55 (11): 2985-2988. doi:10.1007/s00125-012-2666-2.
- Cao, Shanjin, Jianguo Liu, Lihua Song, et Xiaojing Ma. 2005. « The Protooncogene c-Maf Is an Essential Transcription Factor for IL-10 Gene Expression in Macrophages ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 174 (6): 3484-3492.
- Carramusa, Letizia, Flavia Contino, Arianna Ferro, Luigi Minafra, Giovanni Perconti, Agata Giallongo, et Salvatore Feo. 2007. « The PVT-1 Oncogene Is a Myc Protein Target That Is Overexpressed in Transformed Cells ». *Journal of Cellular Physiology* 213 (2): 511-518. doi:10.1002/jcp.21133.
- Cartron, P F, D Loussouarn, M Campone, S A Martin, et F M Vallette. 2012. « Prognostic Impact of the Expression/phosphorylation of the BH3-Only Proteins of the BCL-2 Family in Glioblastoma Multiforme ». *Cell Death & Disease* 3: e421. doi:10.1038/cddis.2012.150.
- Castellino, Robert C, Benjamin G Barwick, Matthew Schniederjan, Meghan C Buss, Oren Becher, Dolores Hambarzumyan, Tobey J Macdonald, Daniel J Brat, et Donald L Durden. 2010. « Heterozygosity for Pten Promotes Tumorigenesis in a Mouse Model of Medulloblastoma ». *PLoS One* 5 (5): e10849. doi:10.1371/journal.pone.0010849.
- Chadick, James Z, et Francisco J Asturias. 2005. « Structure of Eukaryotic Mediator Complexes ». *Trends in Biochemical Sciences* 30 (5): 264-271. doi:10.1016/j.tibs.2005.03.001.

- Chaigne-Delalande, Benjamin, Jean-François Moreau, et Patrick Legembre. 2008. « Rewinding the DISC ». *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* 56 (1): 9-14. doi:10.1007/s00005-008-0002-9.
- Chang, Brian S., Ameeta Kelekar, Marian H. Harris, John E. Harlan, Stephen W. Fesik, et Craig B. Thompson. 1999. « The BH3 Domain of Bcl-xS Is Required for Inhibition of the Antiapoptotic Function of Bcl-xL ». *Molecular and Cellular Biology* 19 (10): 6673-6681.
- Chen, Bo, et Constance L Cepko. 2007. « Requirement of Histone Deacetylase Activity for the Expression of Critical Photoreceptor Genes ». *BMC Developmental Biology* 7: 78. doi:10.1186/1471-213X-7-78.
- Chen, Qin, Dennis H Dowhan, Dongcai Liang, David D Moore, et Paul A Overbeek. 2002. « CREB-Binding protein/p300 Co-Activation of Crystallin Gene Expression ». *The Journal of Biological Chemistry* 277 (27): 24081-24089. doi:10.1074/jbc.M201821200.
- Chen, Z, M Naito, S Hori, T Mashima, T Yamori, et T Tsuruo. 1999. « A Human IAP-Family Gene, Apollon, Expressed in Human Brain Cancer Cells ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 264 (3): 847-854. doi:10.1006/bbrc.1999.1585.
- Cheng, Hong, Tomas S Aleman, Artur V Cideciyan, Ritu Khanna, Samuel G Jacobson, et Anand Swaroop. 2006. « In Vivo Function of the Orphan Nuclear Receptor NR2E3 in Establishing Photoreceptor Identity during Mammalian Retinal Development ». *Human Molecular Genetics* 15 (17): 2588-2602. doi:10.1093/hmg/ddl185.
- Chesi, Marta, et P Leif Bergsagel. 2013. « Molecular Pathogenesis of Multiple Myeloma: Basic and Clinical Updates ». *International Journal of Hematology* 97 (3): 313-323. doi:10.1007/s12185-013-1291-2.
- Chesler, Louis, Chris Schlieve, David D Goldenberg, Anna Kenney, Grace Kim, Alex McMillan, Katherine K Matthay, David Rowitch, et William A Weiss. 2006. « Inhibition of Phosphatidylinositol 3-Kinase Destabilizes Mycn Protein and Blocks Malignant Progression in Neuroblastoma ». *Cancer Research* 66 (16): 8139-8146. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-2769.
- Cheung, Wan Cheung, Joong Su Kim, Michael Linden, Liangping Peng, Brian Van Ness, Roberto D Polakiewicz, et Siegfried Janz. 2004. « Novel Targeted Deregulation of c-Myc Cooperates with Bcl-X(L) to Cause Plasma Cell Neoplasms in Mice ». *The Journal of Clinical Investigation* 113 (12): 1763-1773. doi:10.1172/JCI20369.
- Chipuk, Jerry E, Tomomi Kuwana, Lisa Bouchier-Hayes, Nathalie M Droin, Donald D Newmeyer, Martin Schuler, et Douglas R Green. 2004. « Direct Activation of Bax by p53 Mediates Mitochondrial Membrane Permeabilization and Apoptosis ». *Science (New York, N.Y.)* 303 (5660): 1010-1014. doi:10.1126/science.1092734.
- Chipuk, Jerry E, Tudor Moldoveanu, Fabien Llambi, Melissa J Parsons, et Douglas R Green. 2010. « The BCL-2 Family Reunion ». *Molecular Cell* 37 (3): 299-310. doi:10.1016/j.molcel.2010.01.025.
- Chng, W J, O Glebov, P L Bergsagel, et W M Kuehl. 2007. « Genetic Events in the Pathogenesis of Multiple Myeloma ». *Best Practice & Research. Clinical Haematology* 20 (4): 571-596. doi:10.1016/j.beha.2007.08.004.
- Cho, Yoon-Jae, Aviad Tsherniak, Pablo Tamayo, Sandro Santagata, Azra Ligon, Heidi Greulich, Rameen Berhoukim, et al. 2011. « Integrative Genomic Analysis of Medulloblastoma Identifies a Molecular Subgroup That Drives Poor Clinical Outcome ». *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 29 (11): 1424-1430. doi:10.1200/JCO.2010.28.5148.
- Clarke, Michael F, John E Dick, Peter B Dirks, Connie J Eaves, Catriona H M Jamieson, D Leanne Jones, Jane Visvader, Irving L Weissman, et Geoffrey M Wahl. 2006. « Cancer Stem Cells-- Perspectives on Current Status and Future Directions: AACR Workshop on Cancer Stem Cells ». *Cancer Research* 66 (19): 9339-9344. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-3126.

- Cleary, M L, S D Smith, et J Sklar. 1986. « Cloning and Structural Analysis of cDNAs for Bcl-2 and a Hybrid Bcl-2/immunoglobulin Transcript Resulting from the t(14;18) Translocation ». *Cell* 47 (1): 19-28.
- Clifford, Steven C, Meryl E Lusher, Janet C Lindsey, Jacqueline A Langdon, Richard J Gilbertson, Debbie Straughton, et David W Ellison. 2006. « Wnt/Wingless Pathway Activation and Chromosome 6 Loss Characterize a Distinct Molecular Sub-Group of Medulloblastomas Associated with a Favorable Prognosis ». *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 5 (22): 2666-2670.
- Comings, D E. 1973. « A General Theory of Carcinogenesis ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 70 (12): 3324-3328.
- Czabotar, Peter E, Guillaume Lessene, Andreas Strasser, et Jerry M Adams. 2014. « Control of Apoptosis by the BCL-2 Protein Family: Implications for Physiology and Therapy ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 15 (1): 49-63. doi:10.1038/nrm3722.
- Dahmane, N, et A Ruiz i Altaba. 1999. « Sonic Hedgehog Regulates the Growth and Patterning of the Cerebellum ». *Development (Cambridge, England)* 126 (14): 3089-3100.
- Danial, Nika N, et Stanley J Korsmeyer. 2004. « Cell Death: Critical Control Points ». *Cell* 116 (2): 205-219.
- Davis, A A, M M Matzuk, et T A Reh. 2000. « Activin A Promotes Progenitor Differentiation into Photoreceptors in Rodent Retina ». *Molecular and Cellular Neurosciences* 15 (1): 11-21. doi:10.1006/mcne.1999.0806.
- Day, Catherine L, Callum Smits, F Cindy Fan, Erinna F Lee, W Douglas Fairlie, et Mark G Hinds. 2008. « Structure of the BH3 Domains from the p53-Inducible BH3-Only Proteins Noxa and Puma in Complex with Mcl-1 ». *Journal of Molecular Biology* 380 (5): 958-971. doi:10.1016/j.jmb.2008.05.071.
- Del Valle, Luis, Sahnila Enam, Adam Lassak, Jin Yiang Wang, Sidney Croul, Kamel Khalili, et Krzysztof Reiss. 2002. « Insulin-like Growth Factor I Receptor Activity in Human Medulloblastomas ». *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 8 (6): 1822-1830.
- Du, C, M Fang, Y Li, L Li, et X Wang. 2000. « Smac, a Mitochondrial Protein That Promotes Cytochrome c-Dependent Caspase Activation by Eliminating IAP Inhibition ». *Cell* 102 (1): 33-42.
- Dubuc, Adrian M, Marc Remke, Andrey Korshunov, Paul A Northcott, Shing H Zhan, Maria Mendez-Lago, Marcel Kool, et al. 2013. « Aberrant Patterns of H3K4 and H3K27 Histone Lysine Methylation Occur across Subgroups in Medulloblastoma ». *Acta Neuropathologica* 125 (3): 373-384. doi:10.1007/s00401-012-1070-9.
- Edlich, Frank, Soojay Banerjee, Motoshi Suzuki, Megan M Cleland, Damien Arnoult, Chunxin Wang, Albert Neutzner, Nico Tjandra, et Richard J Youle. 2011. « Bcl-x(L) Retrotranslocates Bax from the Mitochondria into the Cytosol ». *Cell* 145 (1): 104-116. doi:10.1016/j.cell.2011.02.034.
- Eichmann, A, A Grapin-Botton, L Kelly, T Graf, N M Le Douarin, et M Sieweke. 1997. « The Expression Pattern of the mafB/kr Gene in Birds and Mice Reveals That the Kreisler Phenotype Does Not Represent a Null Mutant ». *Mechanisms of Development* 65 (1-2): 111-122.
- Ellison, David W, Mehmet Kocak, James Dalton, Hisham Megahed, Meryl E Lusher, Sarra L Ryan, Wei Zhao, et al. 2011. « Definition of Disease-Risk Stratification Groups in Childhood Medulloblastoma Using Combined Clinical, Pathologic, and Molecular Variables ». *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 29 (11): 1400-1407. doi:10.1200/JCO.2010.30.2810.
- Eychène, Alain, Nathalie Rocques, et Celio Pouponnot. 2008. « A New MAFia in Cancer ». *Nature Reviews. Cancer* 8 (9): 683-693. doi:10.1038/nrc2460.
- Fan, Xing, William Matsui, Leila Khaki, Duncan Stearns, Jiong Chun, Yue-Ming Li, et Charles G Eberhart. 2006. « Notch Pathway Inhibition Depletes Stem-like Cells and Blocks Engraftment

- in Embryonal Brain Tumors ». *Cancer Research* 66 (15): 7445-7452. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-0858.
- Fan, Y-H, Y Yu, R-F Mao, X-J Tan, G-F Xu, H Zhang, X-B Lu, S-B Fu, et J Yang. 2011. « USP4 Targets TAK1 to Downregulate TNF α -Induced NF- κ B Activation ». *Cell Death and Differentiation* 18 (10): 1547-1560. doi:10.1038/cdd.2011.11.
- Farndon, P A, R G Del Mastro, D G Evans, et M W Kilpatrick. 1992. « Location of Gene for Gorlin Syndrome ». *Lancet* 339 (8793): 581-582.
- Fattet, Sarah, Christine Haberler, Patricia Legoix, Pascale Varlet, Arielle Lellouch-Tubiana, Severine Lair, Elodie Manie, et al. 2009. « Beta-Catenin Status in Paediatric Medulloblastomas: Correlation of Immunohistochemical Expression with Mutational Status, Genetic Profiles, and Clinical Characteristics ». *The Journal of Pathology* 218 (1): 86-94. doi:10.1002/path.2514.
- Finkelstein-Shechter, Tal, Adam Gassas, Donald Mabbott, Annie Huang, Ute Bartels, Uri Tabori, Laura Janzen, et al. 2010. « Atypical Teratoid or Rhabdoid Tumors: Improved Outcome with High-Dose Chemotherapy ». *Journal of Pediatric Hematology/oncology* 32 (5): e182-186. doi:10.1097/MPH.0b013e3181dce1a2.
- Follis, Arielle Viacava, Jerry E Chipuk, John C Fisher, Mi-Kyung Yun, Christy R Grace, Amanda Nourse, Katherine Baran, et al. 2013. « PUMA Binding Induces Partial Unfolding within BCL-xL to Disrupt p53 Binding and Promote Apoptosis ». *Nature Chemical Biology* 9 (3): 163-168. doi:10.1038/nchembio.1166.
- Fonseca, R, P L Bergsagel, J Drach, J Shaughnessy, N Gutierrez, A K Stewart, G Morgan, et al. 2009. « International Myeloma Working Group Molecular Classification of Multiple Myeloma: Spotlight Review ». *Leukemia* 23 (12): 2210-2221. doi:10.1038/leu.2009.174.
- Friedman, James S, Hemant Khanna, Prabodh K Swain, Raphael Denicola, Hong Cheng, Kenneth P Mitton, Christian H Weber, David Hicks, et Anand Swaroop. 2004. « The Minimal Transactivation Domain of the Basic Motif-Leucine Zipper Transcription Factor NRL Interacts with TATA-Binding Protein ». *The Journal of Biological Chemistry* 279 (45): 47233-47241. doi:10.1074/jbc.M408298200.
- Friend, S H, R Bernards, S Rogelj, R A Weinberg, J M Rapaport, D M Albert, et T P Dryja. 1986. « A Human DNA Segment with Properties of the Gene That Predisposes to Retinoblastoma and Osteosarcoma ». *Nature* 323 (6089): 643-646. doi:10.1038/323643a0.
- Fujiwara, K T, K Kataoka, et M Nishizawa. 1993. « Two New Members of the Maf Oncogene Family, mafK and mafF, Encode Nuclear B-Zip Proteins Lacking Putative Trans-Activator Domain ». *Oncogene* 8 (9): 2371-2380.
- Furuta, A, J D Rothstein, et L J Martin. 1997. « Glutamate Transporter Protein Subtypes Are Expressed Differentially during Rat CNS Development ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 17 (21): 8363-8375.
- Gabellini, Chiara, Laura Castellini, Daniela Trisciuglio, Michael Kracht, Gabriella Zupi, et Donatella Del Bufalo. 2008. « Involvement of Nuclear Factor-Kappa B in Bcl-xL-Induced Interleukin 8 Expression in Glioblastoma ». *Journal of Neurochemistry* 107 (3): 871-882. doi:10.1111/j.1471-4159.2008.05661.x.
- Gajjar, Amar, Clinton F Stewart, David W Ellison, Sue Kaste, Larry E Kun, Roger J Packer, Stewart Goldman, et al. 2013. « Phase I Study of Vismodegib in Children with Recurrent or Refractory Medulloblastoma: A Pediatric Brain Tumor Consortium Study ». *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 19 (22): 6305-6312. doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-1425.
- Garzia, Livia, Immacolata Andolfo, Emilio Cusanelli, Natascia Marino, Giuseppe Petrosino, Daniela De Martino, Veronica Esposito, et al. 2009. « MicroRNA-199b-5p Impairs Cancer Stem Cells through Negative Regulation of HES1 in Medulloblastoma ». *PLoS One* 4 (3): e4998. doi:10.1371/journal.pone.0004998.

- Gavathiotis, Evripidis, Denis E Reyna, Joseph A Bellairs, Elizaveta S Leshchiner, et Loren D Walensky. 2012. « Direct and Selective Small-Molecule Activation of Proapoptotic BAX ». *Nature Chemical Biology* 8 (7): 639-645. doi:10.1038/nchembio.995.
- Gavathiotis, Evripidis, Denis E Reyna, Marguerite L Davis, Gregory H Bird, et Loren D Walensky. 2010. « BH3-Triggered Structural Reorganization Drives the Activation of Proapoptotic BAX ». *Molecular Cell* 40 (3): 481-492. doi:10.1016/j.molcel.2010.10.019.
- Gibson, Paul, Yiai Tong, Giles Robinson, Margaret C Thompson, D Spencer Currie, Christopher Eden, Tanya A Kranenburg, et al. 2010. « Subtypes of Medulloblastoma Have Distinct Developmental Origins ». *Nature* 468 (7327): 1095-1099. doi:10.1038/nature09587.
- Gilbertson, Richard J, et David W Ellison. 2008. « The Origins of Medulloblastoma Subtypes ». *Annual Review of Pathology* 3: 341-365. doi:10.1146/annurev.pathmechdis.3.121806.151518.
- Giorgini, Simona, Daniela Trisciuglio, Chiara Gabellini, Marianna Desideri, Laura Castellini, Cristina Colarossi, Uwe Zangemeister-Wittke, Gabriella Zupi, et Donatella Del Bufalo. 2007. « Modulation of Bcl-xL in Tumor Cells Regulates Angiogenesis through CXCL8 Expression ». *Molecular Cancer Research: MCR* 5 (8): 761-771. doi:10.1158/1541-7786.MCR-07-0088.
- Gomez-Bougie, Patricia, et Martine Amiot. 2013. « Apoptotic Machinery Diversity in Multiple Myeloma Molecular Subtypes ». *Frontiers in Immunology* 4: 467. doi:10.3389/fimmu.2013.00467.
- Green, Douglas R, et Jerry E Chipuk. 2008. « Apoptosis: Stabbed in the BAX ». *Nature* 455 (7216): 1047-1049. doi:10.1038/4551047a.
- Green, Douglas R, et Gerard I Evan. 2002. « A Matter of Life and Death ». *Cancer Cell* 1 (1): 19-30.
- Gylfe, Alexandra E, Johanna Kondelin, Mikko Turunen, Heikki Ristolainen, Riku Katainen, Esa Pitkänen, Eevi Kaasinen, et al. 2013. « Identification of Candidate Oncogenes in Human Colorectal Cancers with Microsatellite Instability ». *Gastroenterology* 145 (3): 540-543.e22. doi:10.1053/j.gastro.2013.05.015.
- Hanada, M, D Delia, A Aiello, E Stadtmauer, et J C Reed. 1993. « Bcl-2 Gene Hypomethylation and High-Level Expression in B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia ». *Blood* 82 (6): 1820-1828.
- Hanamura, I, S Iida, Y Akano, Y Hayami, M Kato, K Miura, S Harada, et al. 2001. « Ectopic Expression of MAFB Gene in Human Myeloma Cells Carrying (14;20)(q32;q11) Chromosomal Translocations ». *Japanese Journal of Cancer Research: Gann* 92 (6): 638-644.
- Hang, Yan, Tsunehiko Yamamoto, Richard K P Benninger, Marcela Brissova, Min Guo, Will Bush, David W Piston, et al. 2014. « The MafA Transcription Factor Becomes Essential to Islet B-Cells Soon after Birth ». *Diabetes*, février. doi:10.2337/db13-1001.
- He, T C, A B Sparks, C Rago, H Hermeking, L Zawel, L T da Costa, P J Morin, B Vogelstein, et K W Kinzler. 1998. « Identification of c-MYC as a Target of the APC Pathway ». *Science (New York, N.Y.)* 281 (5382): 1509-1512.
- Hegde, Ramesh, Srinivasa M Srinivasula, Zhijia Zhang, Richard Wassell, Rula Mukattash, Lucia Cilenti, Garrett DuBois, et al. 2002. « Identification of Omi/HtrA2 as a Mitochondrial Apoptotic Serine Protease That Disrupts Inhibitor of Apoptosis Protein-Caspase Interaction ». *The Journal of Biological Chemistry* 277 (1): 432-438. doi:10.1074/jbc.M109721200.
- Hemmati, Houman D, Ichiro Nakano, Jorge A Lazareff, Michael Masterman-Smith, Daniel H Geschwind, Marianne Bronner-Fraser, et Harley I Kornblum. 2003. « Cancerous Stem Cells Can Arise from Pediatric Brain Tumors ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (25): 15178-15183. doi:10.1073/pnas.2036535100.
- Henssen, Anton, Theresa Thor, Andrea Odersky, Lukas Heukamp, Nicolai El-Hindy, Anneleen Beckers, Frank Speleman, et al. 2013. « BET Bromodomain Protein Inhibition Is a Therapeutic Option for Medulloblastoma ». *Oncotarget* 4 (11): 2080-2095.
- Herath, N I, N Rocques, A Garancher, A Eychène, et C Pouponnot. 2014. « GSK3-Mediated MAF Phosphorylation in Multiple Myeloma as a Potential Therapeutic Target ». *Blood Cancer Journal* 4: e175. doi:10.1038/bcj.2013.67.

- Hernan, I, M J Gamundi, E Borràs, M Maseras, B García-Sandoval, F Blanco-Kelly, C Ayuso, et M Carballo. 2012. « Novel p.M96T Variant of NRL and shRNA-Based Suppression and Replacement of NRL Mutants Associated with Autosomal Dominant Retinitis Pigmentosa ». *Clinical Genetics* 82 (5): 446-452. doi:10.1111/j.1399-0004.2011.01796.x.
- Ho, I C, M R Hodge, J W Rooney, et L H Glimcher. 1996. « The Proto-Oncogene c-Maf Is Responsible for Tissue-Specific Expression of Interleukin-4 ». *Cell* 85 (7): 973-983.
- Ho, I C, D Lo, et L H Glimcher. 1998. « C-Maf Promotes T Helper Cell Type 2 (Th2) and Attenuates Th1 Differentiation by Both Interleukin 4-Dependent and -Independent Mechanisms ». *The Journal of Experimental Medicine* 188 (10): 1859-1866.
- Holinger, E P, T Chittenden, et R J Lutz. 1999. « Bak BH3 Peptides Antagonize Bcl-xL Function and Induce Apoptosis through Cytochrome c-Independent Activation of Caspases ». *The Journal of Biological Chemistry* 274 (19): 13298-13304.
- Homma, Yoichiro, Shanjin Cao, Xiaoyan Shi, et Xiaojing Ma. 2007. « The Th2 Transcription Factor c-Maf Inhibits IL-12p35 Gene Expression in Activated Macrophages by Targeting NF-kappaB Nuclear Translocation ». *Journal of Interferon & Cytokine Research: The Official Journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* 27 (9): 799-808. doi:10.1089/jir.2007.0006.
- Hsu, Y T, K G Wolter, et R J Youle. 1997. « Cytosol-to-Membrane Redistribution of Bax and Bcl-X(L) during Apoptosis ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (8): 3668-3672.
- Huang, D C, J M Adams, et S Cory. 1998. « The Conserved N-Terminal BH4 Domain of Bcl-2 Homologues Is Essential for Inhibition of Apoptosis and Interaction with CED-4 ». *The EMBO Journal* 17 (4): 1029-1039. doi:10.1093/emboj/17.4.1029.
- Huang, K, M S Serria, H Nakabayashi, S Nishi, et M Sakai. 2000. « Molecular Cloning and Functional Characterization of the Mouse mafB Gene ». *Gene* 242 (1-2): 419-426.
- Hurt, Elaine M, Adrian Wiestner, Andreas Rosenwald, A L Shaffer, Elias Campo, Tom Grogan, P Leif Bergsagel, W Michael Kuehl, et Louis M Staudt. 2004. « Overexpression of c-Maf Is a Frequent Oncogenic Event in Multiple Myeloma That Promotes Proliferation and Pathological Interactions with Bone Marrow Stroma ». *Cancer Cell* 5 (2): 191-199.
- Igarashi, Kazuhiko, et Jiying Sun. 2006. « The Heme-Bach1 Pathway in the Regulation of Oxidative Stress Response and Erythroid Differentiation ». *Antioxidants & Redox Signaling* 8 (1-2): 107-118. doi:10.1089/ars.2006.8.107.
- Ikegaki, N, M Katsumata, J Minna, et Y Tsujimoto. 1994. « Expression of Bcl-2 in Small Cell Lung Carcinoma Cells ». *Cancer Research* 54 (1): 6-8.
- Inagaki, Atsushi, Emi Tajima, Miyuki Uranishi, Haruhito Totani, Yu Asao, Hiroka Ogura, Ayako Masaki, et al. 2013. « Global Real-Time Quantitative Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction Detecting Proto-Oncogenes Associated with 14q32 Chromosomal Translocation as a Valuable Marker for Predicting Survival in Multiple Myeloma ». *Leukemia Research* 37 (12): 1648-1655. doi:10.1016/j.leukres.2013.09.026.
- Ionov, Y, H Yamamoto, S Krajewski, J C Reed, et M Perucho. 2000. « Mutational Inactivation of the Proapoptotic Gene BAX Confers Selective Advantage during Tumor Clonal Evolution ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (20): 10872-10877. doi:10.1073/pnas.190210897.
- Jia, Shunji, Di Wu, Cencan Xing, et Anming Meng. 2009. « Smad2/3 Activities Are Required for Induction and Patterning of the Neuroectoderm in Zebrafish ». *Developmental Biology* 333 (2): 273-284. doi:10.1016/j.ydbio.2009.06.037.
- Johnsen, J I, L Segerström, A Orrego, L Elfman, M Henriksson, B Kågedal, S Eksborg, B Sveinbjörnsson, et P Kogner. 2008. « Inhibitors of Mammalian Target of Rapamycin Downregulate MYCN Protein Expression and Inhibit Neuroblastoma Growth in Vitro and in Vivo ». *Oncogene* 27 (20): 2910-2922. doi:10.1038/sj.onc.1210938.

- Jones, David T W, Natalie Jäger, Marcel Kool, Thomas Zichner, Barbara Hutter, Marc Sultan, Yoon-Jae Cho, et al. 2012. « Dissecting the Genomic Complexity Underlying Medulloblastoma ». *Nature* 488 (7409): 100-105. doi:10.1038/nature11284.
- Juin, Philippe, Olivier Geneste, Fabien Gautier, Stéphane Depil, et Mario Campone. 2013. « Decoding and Unlocking the BCL-2 Dependency of Cancer Cells ». *Nature Reviews. Cancer* 13 (7): 455-465. doi:10.1038/nrc3538.
- Kanai, Kenichi, Hasan Mahmud Reza, Akiyo Kamitani, Yuri Hamazaki, Song-lee Han, Kunio Yasuda, et Kohsuke Kataoka. 2010. « SUMOylation Negatively Regulates Transcriptional and Oncogenic Activities of MafA ». *Genes to Cells: Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms* 15 (9): 971-982. doi:10.1111/j.1365-2443.2010.01431.x.
- Kanda, Atsuhiko, James S Friedman, Koji M Nishiguchi, et Anand Swaroop. 2007. « Retinopathy Mutations in the bZIP Protein NRL Alter Phosphorylation and Transcriptional Activity ». *Human Mutation* 28 (6): 589-598. doi:10.1002/humu.20488.
- Kannan, Meenakshi B, Vera Solovieva, et Volker Blank. 2012. « The Small MAF Transcription Factors MAFF, MAFG and MAFK: Current Knowledge and Perspectives ». *Biochimica et Biophysica Acta* 1823 (10): 1841-1846. doi:10.1016/j.bbamcr.2012.06.012.
- Kanno, Chikako, Yoshiko Kashiwagi, Kuniko Horie, Motoko Inomata, Teiko Yamamoto, Chifumi Kitanaka, et Hidetoshi Yamashita. 2009. « Activin Inhibits Cell Growth and Induces Differentiation in Human Retinoblastoma y79 Cells ». *Current Eye Research* 34 (8): 652-659.
- Kataoka, K, M Nishizawa, et S Kawai. 1993. « Structure-Function Analysis of the Maf Oncogene Product, a Member of the B-Zip Protein Family ». *Journal of Virology* 67 (4): 2133-2141.
- Kataoka, K, M Noda, et M Nishizawa. 1994. « Maf Nuclear Oncoprotein Recognizes Sequences Related to an AP-1 Site and Forms Heterodimers with Both Fos and Jun ». *Molecular and Cellular Biology* 14 (1): 700-712.
- . 1996. « Transactivation Activity of Maf Nuclear Oncoprotein Is Modulated by Jun, Fos and Small Maf Proteins ». *Oncogene* 12 (1): 53-62.
- Kataoka, K, S Shioda, K Yoshitomo-Nakagawa, H Handa, et M Nishizawa. 2001. « Maf and Jun Nuclear Oncoproteins Share Downstream Target Genes for Inducing Cell Transformation ». *The Journal of Biological Chemistry* 276 (39): 36849-36856. doi:10.1074/jbc.M102234200.
- Kataoka, Kohsuke. 2007. « Multiple Mechanisms and Functions of Maf Transcription Factors in the Regulation of Tissue-Specific Genes ». *Journal of Biochemistry* 141 (6): 775-781. doi:10.1093/jb/mvm105.
- Kawai, S, N Goto, K Kataoka, T Saegusa, H Shinno-Kohno, et M Nishizawa. 1992. « Isolation of the Avian Transforming Retrovirus, AS42, Carrying the v-Maf Oncogene and Initial Characterization of Its Gene Product ». *Virology* 188 (2): 778-784.
- Kawauchi, Daisuke, Giles Robinson, Tamar Uziel, Paul Gibson, Jerold Rehg, Cuilan Gao, David Finkelstein, et al. 2012. « A Mouse Model of the Most Aggressive Subgroup of Human Medulloblastoma ». *Cancer Cell* 21 (2): 168-180. doi:10.1016/j.ccr.2011.12.023.
- Kawauchi, S, S Takahashi, O Nakajima, H Ogino, M Morita, M Nishizawa, K Yasuda, et M Yamamoto. 1999. « Regulation of Lens Fiber Cell Differentiation by Transcription Factor c-Maf ». *The Journal of Biological Chemistry* 274 (27): 19254-19260.
- Kelly, L M, U Englmeier, I Lafon, M H Sieweke, et T Graf. 2000. « MafB Is an Inducer of Monocytic Differentiation ». *The EMBO Journal* 19 (9): 1987-1997. doi:10.1093/emboj/19.9.1987.
- Kelly, Priscilla N, Stephanie Grabow, Alex R D Delbridge, Andreas Strasser, et Jerry M Adams. 2011. « Endogenous Bcl-xL Is Essential for Myc-Driven Lymphomagenesis in Mice ». *Blood* 118 (24): 6380-6386. doi:10.1182/blood-2011-07-367672.
- Kerppola, T K, et T Curran. 1994. « A Conserved Region Adjacent to the Basic Domain Is Required for Recognition of an Extended DNA Binding Site by Maf/Nrl Family Proteins ». *Oncogene* 9 (11): 3149-3158.

- Kim, J I, I C Ho, M J Grusby, et L H Glimcher. 1999. « The Transcription Factor c-Maf Controls the Production of Interleukin-4 but Not Other Th2 Cytokines ». *Immunity* 10 (6): 745-751.
- Kim, J I, T Li, I C Ho, M J Grusby, et L H Glimcher. 1999. « Requirement for the c-Maf Transcription Factor in Crystallin Gene Regulation and Lens Development ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (7): 3781-3785.
- Kim, Jung-Woong, Sang-Min Jang, Chul-Hong Kim, Joo-Hee An, et Kyung-Hee Choi. 2012. « Transcriptional Activity of Neural Retina Leucine Zipper (Nrl) Is Regulated by c-Jun N-Terminal Kinase and Tip60 during Retina Development ». *Molecular and Cellular Biology* 32 (9): 1720-1732. doi:10.1128/MCB.06440-11.
- Knudson, A G, Jr. 1971. « Mutation and Cancer: Statistical Study of Retinoblastoma ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 68 (4): 820-823.
- Kool, Marcel, David T W Jones, Natalie Jäger, Paul A Northcott, Trevor J Pugh, Volker Hovestadt, Rosario M Piro, et al. 2014. « Genome Sequencing of SHH Medulloblastoma Predicts Genotype-Related Response to Smoothed Inhibition ». *Cancer Cell* 25 (3): 393-405. doi:10.1016/j.ccr.2014.02.004.
- Kool, Marcel, Andrey Korshunov, Marc Remke, David T W Jones, Maria Schlanstein, Paul A Northcott, Yoon-Jae Cho, et al. 2012. « Molecular Subgroups of Medulloblastoma: An International Meta-Analysis of Transcriptome, Genetic Aberrations, and Clinical Data of WNT, SHH, Group 3, and Group 4 Medulloblastomas ». *Acta Neuropathologica* 123 (4): 473-484. doi:10.1007/s00401-012-0958-8.
- Kool, Marcel, Jan Koster, Jens Bunt, Nancy E Hasselt, Arjan Lakeman, Peter van Sluis, Dirk Troost, et al. 2008. « Integrated Genomics Identifies Five Medulloblastoma Subtypes with Distinct Genetic Profiles, Pathway Signatures and Clinicopathological Features ». *PLoS One* 3 (8): e3088. doi:10.1371/journal.pone.0003088.
- Kroemer, Guido, Lorenzo Galluzzi, et Catherine Brenner. 2007. « Mitochondrial Membrane Permeabilization in Cell Death ». *Physiological Reviews* 87 (1): 99-163. doi:10.1152/physrev.00013.2006.
- Ku, Bonsu, Chengyu Liang, Jae U Jung, et Byung-Ha Oh. 2011. « Evidence That Inhibition of BAX Activation by BCL-2 Involves Its Tight and Preferential Interaction with the BH3 Domain of BAX ». *Cell Research* 21 (4): 627-641. doi:10.1038/cr.2010.149.
- Kuehl, W Michael, et P Leif Bergsagel. 2002. « Multiple Myeloma: Evolving Genetic Events and Host Interactions ». *Nature Reviews. Cancer* 2 (3): 175-187. doi:10.1038/nrc746.
- Kumar, R, S Chen, D Scheurer, Q L Wang, E Duh, C H Sung, A Rehemtulla, A Swaroop, R Adler, et D J Zack. 1996. « The bZIP Transcription Factor Nrl Stimulates Rhodopsin Promoter Activity in Primary Retinal Cell Cultures ». *The Journal of Biological Chemistry* 271 (47): 29612-29618.
- Lai, Chen-Yen, Shin-Ying Lin, Chia-Kai Wu, Li-Tzu Yeh, Huey-Kang Sytwu, et Shi-Chuen Miaw. 2012. « Tyrosine Phosphorylation of c-Maf Enhances the Expression of IL-4 Gene ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 189 (4): 1545-1550. doi:10.4049/jimmunol.1200405.
- Lalier, Lisenn, Pierre-François Cartron, Philippe Juin, Svetlana Nedelkina, Stephen Manon, Burkhardt Bechinger, et François M Vallette. 2007. « Bax Activation and Mitochondrial Insertion during Apoptosis ». *Apoptosis: An International Journal on Programmed Cell Death* 12 (5): 887-896. doi:10.1007/s10495-007-0749-1.
- Latha, Khatri, Ming Li, Vaibhav Chumbalkar, Anupama Gururaj, YeoHyeon Hwang, Sumana Dakeng, Raymond Sawaya, et al. 2013. « Nuclear EGFRVIII-STAT5b Complex Contributes to Glioblastoma Cell Survival by Direct Activation of the Bcl-XL Promoter ». *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer* 132 (3): 509-520. doi:10.1002/ijc.27690.
- Lecoin, Laure, Karine Sii-Felice, Celio Pouponnot, Alain Eychène, et Marie Paule Felder-Schmittbuhl. 2004. « Comparison of Maf Gene Expression Patterns during Chick Embryo Development ». *Gene Expression Patterns: GEP* 4 (1): 35-46.

- Lee, Audra, Jessica D Kessler, Tracy-Ann Read, Constanze Kaiser, Denis Corbeil, Wieland B Huttner, Jane E Johnson, et Robert J Wechsler-Reya. 2005. « Isolation of Neural Stem Cells from the Postnatal Cerebellum ». *Nature Neuroscience* 8 (6): 723-729. doi:10.1038/nn1473.
- Lee, Eunice Y, Hongkai Ji, Zhengqing Ouyang, Baiyu Zhou, Wenxiu Ma, Steven A Vokes, Andrew P McMahon, Wing H Wong, et Matthew P Scott. 2010. « Hedgehog Pathway-Regulated Gene Networks in Cerebellum Development and Tumorigenesis ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (21): 9736-9741. doi:10.1073/pnas.1004602107.
- Lee, Y, R Kawagoe, K Sasai, Y Li, H R Russell, T Curran, et P J McKinnon. 2007. « Loss of Suppressor-of-Fused Function Promotes Tumorigenesis ». *Oncogene* 26 (44): 6442-6447. doi:10.1038/sj.onc.1210467.
- Leu, J I-Ju, Patrick Dumont, Michael Hafey, Maureen E Murphy, et Donna L George. 2004. « Mitochondrial p53 Activates Bak and Causes Disruption of a Bak-Mcl1 Complex ». *Nature Cell Biology* 6 (5): 443-450. doi:10.1038/ncb1123.
- Lewis, Paula M, Amel Gritli-Linde, Richard Smeyne, Andreas Kottmann, et Andrew P McMahon. 2004. « Sonic Hedgehog Signaling Is Required for Expansion of Granule Neuron Precursors and Patterning of the Mouse Cerebellum ». *Developmental Biology* 270 (2): 393-410. doi:10.1016/j.ydbio.2004.03.007.
- Liang, Li, Yihui Fan, Jin Cheng, Da Cheng, Yanling Zhao, Baoshan Cao, Liwen Ma, et al. 2013. « TAK1 Ubiquitination Regulates Doxorubicin-Induced NF-κB Activation ». *Cellular Signalling* 25 (1): 247-254. doi:10.1016/j.cellsig.2012.09.003.
- Lin, Bo-Shiou, Pei-Yun Tsai, Wan-Yun Hsieh, Hsiao-Wei Tsao, Meng-Wei Liu, Roland Grenningloh, Li-Fang Wang, I-Cheng Ho, et Shi-Chuen Miaw. 2010. « SUMOylation Attenuates c-Maf-Dependent IL-4 Expression ». *European Journal of Immunology* 40 (4): 1174-1184. doi:10.1002/eji.200939788.
- Liu, Qiang, et Hong-Gang Wang. 2012. « Anti-Cancer Drug Discovery and Development: Bcl-2 Family Small Molecule Inhibitors ». *Communicative & Integrative Biology* 5 (6): 557-565. doi:10.4161/cib.21554.
- Lohmann, D R, B Brandt, W Höpping, E Passarge, et B Horsthemke. 1994. « Distinct RB1 Gene Mutations with Low Penetrance in Hereditary Retinoblastoma ». *Human Genetics* 94 (4): 349-354.
- Lopes, Rita Bayer, Rathi Gangeswaran, Iain A McNeish, Yaohe Wang, et Nick R Lemoine. 2007. « Expression of the IAP Protein Family Is Dysregulated in Pancreatic Cancer Cells and Is Important for Resistance to Chemotherapy ». *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer* 120 (11): 2344-2352. doi:10.1002/ijc.22554.
- Loscher, Carol J, Karsten Hokamp, John H Wilson, Tiansen Li, Peter Humphries, G Jane Farrar, et Arpad Palfi. 2008. « A Common microRNA Signature in Mouse Models of Retinal Degeneration ». *Experimental Eye Research* 87 (6): 529-534. doi:10.1016/j.exer.2008.08.016.
- Lu, Xun, Gerald P Guanga, Cheng Wan, et Robert B Rose. 2012. « A Novel DNA Binding Mechanism for Maf Basic Region-Leucine Zipper Factors Inferred from a MafA-DNA Complex Structure and Binding Specificities ». *Biochemistry* 51 (48): 9706-9717. doi:10.1021/bi301248j.
- Lv, Sheng-Qing, Young-Ho Kim, Fiaschetti Giulio, Tarek Shalaby, Sumihito Nobusawa, Hui Yang, Zheng Zhou, Michael Grotzer, et Hiroko Ohgaki. 2012. « Genetic Alterations in microRNAs in Medulloblastomas ». *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)* 22 (2): 230-239. doi:10.1111/j.1750-3639.2011.00523.x.
- Mao, Xinliang, A Keith Stewart, Rose Hurren, Alessandro Datti, Xuegong Zhu, Yuanxiao Zhu, Changxin Shi, et al. 2007. « A Chemical Biology Screen Identifies Glucocorticoids That Regulate c-Maf Expression by Increasing Its Proteasomal Degradation through up-Regulation of Ubiquitin ». *Blood* 110 (12): 4047-4054. doi:10.1182/blood-2007-05-088666.
- Massagué, Joan. 2008. « TGFbeta in Cancer ». *Cell* 134 (2): 215-230. doi:10.1016/j.cell.2008.07.001.

- Mears, A J, M Kondo, P K Swain, Y Takada, R A Bush, T L Saunders, P A Sieving, et A Swaroop. 2001. « Nrl Is Required for Rod Photoreceptor Development ». *Nature Genetics* 29 (4): 447-452. doi:10.1038/ng774.
- Mechta-Grigoriou, Fatima, Francois Giudicelli, Cristina Pujades, Patrick Charnay, et Moshe Yaniv. 2003. « C-Jun Regulation and Function in the Developing Hindbrain ». *Developmental Biology* 258 (2): 419-431.
- Meulmeester, Erik, et Peter Ten Dijke. 2011. « The Dynamic Roles of TGF-B in Cancer ». *The Journal of Pathology* 223 (2): 205-218. doi:10.1002/path.2785.
- Milde, Till, Ina Oehme, Andrey Korshunov, Annette Kopp-Schneider, Marc Remke, Paul Northcott, Hedwig E Deubzer, et al. 2010. « HDAC5 and HDAC9 in Medulloblastoma: Novel Markers for Risk Stratification and Role in Tumor Cell Growth ». *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 16 (12): 3240-3252. doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-0395.
- Mitter, Diana, Reinhard Ullmann, Artur Muradyan, Ludger Klein-Hitpass, Deniz Kanber, Katrin Ounap, Marc Kaulisch, et Dietmar Lohmann. 2011. « Genotype-Phenotype Correlations in Patients with Retinoblastoma and Interstitial 13q Deletions ». *European Journal of Human Genetics: EJHG* 19 (9): 947-958. doi:10.1038/ejhg.2011.58.
- Mitton, K P, P K Swain, S Chen, S Xu, D J Zack, et A Swaroop. 2000. « The Leucine Zipper of NRL Interacts with the CRX Homeodomain. A Possible Mechanism of Transcriptional Synergy in Rhodopsin Regulation ». *The Journal of Biological Chemistry* 275 (38): 29794-29799. doi:10.1074/jbc.M003658200.
- Mohammad, Ramzi M, Anton Scott Goustin, Amro Aboukameel, Ben Chen, Sanjeev Banerjee, Guoping Wang, Zaneta Nikolovska-Coleska, Shaomeng Wang, et Ayad Al-Katib. 2007. « Preclinical Studies of TW-37, a New Nonpeptidic Small-Molecule Inhibitor of Bcl-2, in Diffuse Large Cell Lymphoma Xenograft Model Reveal Drug Action on Both Bcl-2 and Mcl-1 ». *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 13 (7): 2226-2235. doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-1574.
- Mohan, Avinash L, Marissa D Friedman, D Ryan Ormond, Michael Tobias, Raj Murali, et Meena Jhanwar-Uniyal. 2012. « PI3K/mTOR Signaling Pathways in Medulloblastoma ». *Anticancer Research* 32 (8): 3141-3146.
- Moldoveanu, Tudor, Ariele Viacava Follis, Richard W Kriwacki, et Douglas R Green. 2014. « Many Players in BCL-2 Family Affairs ». *Trends in Biochemical Sciences* 39 (3): 101-111. doi:10.1016/j.tibs.2013.12.006.
- Montana, Cynthia L, Karen A Lawrence, Natecia L Williams, Nicholas M Tran, Guang-Hua Peng, Shiming Chen, et Joseph C Corbo. 2011. « Transcriptional Regulation of Neural Retina Leucine Zipper (Nrl), a Photoreceptor Cell Fate Determinant ». *The Journal of Biological Chemistry* 286 (42): 36921-36931. doi:10.1074/jbc.M111.279026.
- Moriguchi, Takashi, Michito Hamada, Naoki Morito, Tsumoru Terunuma, Kazuteru Hasegawa, Chuan Zhang, Tomomasa Yokomizo, et al. 2006. « MafB Is Essential for Renal Development and F4/80 Expression in Macrophages ». *Molecular and Cellular Biology* 26 (15): 5715-5727. doi:10.1128/MCB.00001-06.
- Morito, Naoki, Keigyou Yoh, Yuki Fujioka, Takako Nakano, Homare Shimohata, Yuko Hashimoto, Akiko Yamada, et al. 2006. « Overexpression of c-Maf Contributes to T-Cell Lymphoma in Both Mice and Human ». *Cancer Research* 66 (2): 812-819. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-2154.
- Morito, Naoki, Keigyou Yoh, Atsuko Maeda, Takako Nakano, Akiko Fujita, Manabu Kusakabe, Michito Hamada, Takashi Kudo, Kunihiro Yamagata, et Satoru Takahashi. 2011. « A Novel Transgenic Mouse Model of the Human Multiple Myeloma Chromosomal Translocation t(14;16)(q32;q23) ». *Cancer Research* 71 (2): 339-348. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-1057.

- Muchmore, S W, M Sattler, H Liang, R P Meadows, J E Harlan, H S Yoon, D Nettesheim, et al. 1996. « X-Ray and NMR Structure of Human Bcl-xL, an Inhibitor of Programmed Cell Death ». *Nature* 381 (6580): 335-341. doi:10.1038/381335a0.
- Murakami, Yoshiko Idate, Yasushi Yatabe, Teruhiro Sakaguchi, Eiichi Sasaki, Yoriko Yamashita, Naoki Morito, Keigyou Yoh, et al. 2007. « C-Maf Expression in Angioimmunoblastic T-Cell Lymphoma ». *The American Journal of Surgical Pathology* 31 (11): 1695-1702. doi:10.1097/PAS.0b013e318054dbcf.
- Nguyen, M, D G Millar, V W Yong, S J Korsmeyer, et G C Shore. 1993. « Targeting of Bcl-2 to the Mitochondrial Outer Membrane by a COOH-Terminal Signal Anchor Sequence ». *The Journal of Biological Chemistry* 268 (34): 25265-25268.
- Ni Chonghaile, T, et A Letai. 2008. « Mimicking the BH3 Domain to Kill Cancer Cells ». *Oncogene* 27 Suppl 1 (décembre): S149-157. doi:10.1038/onc.2009.52.
- Niida, Atsushi, Takatoshi Hiroko, Mana Kasai, Yoichi Furukawa, Yusuke Nakamura, Yutaka Suzuki, Sumio Sugano, et Tetsu Akiyama. 2004. « DKK1, a Negative Regulator of Wnt Signaling, Is a Target of the Beta-catenin/TCF Pathway ». *Oncogene* 23 (52): 8520-8526. doi:10.1038/sj.onc.1207892.
- Nishizawa, M, K Kataoka, N Goto, K T Fujiwara, et S Kawai. 1989. « V-Maf, a Viral Oncogene That Encodes a "Leucine Zipper" Motif ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86 (20): 7711-7715.
- Nishizawa, Makoto, Kohsuke Kataoka, et Peter K Vogt. 2003. « MafA Has Strong Cell Transforming Ability but Is a Weak Transactivator ». *Oncogene* 22 (39): 7882-7890. doi:10.1038/sj.onc.1206526.
- Northcott, Paul A, Thomas Hielscher, Adrian Dubuc, Stephen Mack, David Shih, Marc Remke, Hani Al-Halabi, et al. 2011. « Pediatric and Adult Sonic Hedgehog Medulloblastomas Are Clinically and Molecularly Distinct ». *Acta Neuropathologica* 122 (2): 231-240. doi:10.1007/s00401-011-0846-7.
- Northcott, Paul A, David T W Jones, Marcel Kool, Giles W Robinson, Richard J Gilbertson, Yoon-Jae Cho, Scott L Pomeroy, et al. 2012. « Medulloblastomics: The End of the Beginning ». *Nature Reviews. Cancer* 12 (12): 818-834. doi:10.1038/nrc3410.
- Northcott, Paul A, Andrey Korshunov, Hendrik Witt, Thomas Hielscher, Charles G Eberhart, Stephen Mack, Eric Bouffet, et al. 2011. « Medulloblastoma Comprises Four Distinct Molecular Variants ». *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 29 (11): 1408-1414. doi:10.1200/JCO.2009.27.4324.
- Northcott, Paul A, David J H Shih, John Peacock, Livia Garzia, A Sorana Morrissy, Thomas Zichner, Adrian M Stütz, et al. 2012. « Subgroup-Specific Structural Variation across 1,000 Medulloblastoma Genomes ». *Nature* 488 (7409): 49-56. doi:10.1038/nature11327.
- O'Brien, Susan, Joseph O Moore, Thomas E Boyd, Loree M Larratt, Aleksander B Skotnicki, Benjamin Koziner, Asher A Chanan-Khan, et al. 2009. « 5-Year Survival in Patients with Relapsed or Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia in a Randomized, Phase III Trial of Fludarabine plus Cyclophosphamide with or without Oblimersen ». *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 27 (31): 5208-5212. doi:10.1200/JCO.2009.22.5748.
- Ochi, Haruki, Hajime Ogino, Yuji Kageyama, et Kunio Yasuda. 2003. « The Stability of the Lens-Specific Maf Protein Is Regulated by Fibroblast Growth Factor (FGF)/ERK Signaling in Lens Fiber Differentiation ». *The Journal of Biological Chemistry* 278 (1): 537-544. doi:10.1074/jbc.M208380200.
- Ogino, H, et K Yasuda. 1998. « Induction of Lens Differentiation by Activation of a bZIP Transcription Factor, L-Maf ». *Science (New York, N.Y.)* 280 (5360): 115-118.
- Oh, Edwin C T, Naheed Khan, Elena Novelli, Hemant Khanna, Enrica Strettoi, et Anand Swaroop. 2007. « Transformation of Cone Precursors to Functional Rod Photoreceptors by bZIP

- Transcription Factor NRL ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (5): 1679-1684. doi:10.1073/pnas.0605934104.
- Olbrot, Martin, Jonathan Rud, Larry G Moss, et Arun Sharma. 2002. « Identification of Beta-Cell-Specific Insulin Gene Transcription Factor RIPE3b1 as Mammalian MafA ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (10): 6737-6742. doi:10.1073/pnas.102168499.
- Oliver, L, S Cordel, I Barbieux, M T LeCabellec, K Meflah, M Grégoire, et F M Vallette. 2002. « Resistance to Apoptosis Is Increased during Metastatic Dissemination of Colon Cancer ». *Clinical & Experimental Metastasis* 19 (2): 175-180.
- Oliver, Trudy G, Tracy Ann Read, Jessica D Kessler, Anriada Mehmeti, Jonathan F Wells, Trang T T Huynh, Simon M Lin, et Robert J Wechsler-Reya. 2005. « Loss of Patched and Disruption of Granule Cell Development in a Pre-Neoplastic Stage of Medulloblastoma ». *Development (Cambridge, England)* 132 (10): 2425-2439. doi:10.1242/dev.01793.
- Oltersdorf, Tilman, Steven W Elmore, Alexander R Shoemaker, Robert C Armstrong, David J Augeri, Barbara A Belli, Milan Bruncko, et al. 2005. « An Inhibitor of Bcl-2 Family Proteins Induces Regression of Solid Tumours ». *Nature* 435 (7042): 677-681. doi:10.1038/nature03579.
- Parsons, D Williams, Meng Li, Xiaosong Zhang, Siân Jones, Rebecca J Leary, Jimmy Cheng-Ho Lin, Simina M Boca, et al. 2011a. « The Genetic Landscape of the Childhood Cancer Medulloblastoma ». *Science (New York, N.Y.)* 331 (6016): 435-439. doi:10.1126/science.1198056.
- . 2011b. « The Genetic Landscape of the Childhood Cancer Medulloblastoma ». *Science (New York, N.Y.)* 331 (6016): 435-439. doi:10.1126/science.1198056.
- Patapoutian, A, et L F Reichardt. 2000. « Roles of Wnt Proteins in Neural Development and Maintenance ». *Current Opinion in Neurobiology* 10 (3): 392-399.
- Patru, Cristina, Luciana Romao, Pascale Varlet, Laure Coulombel, Eric Raponi, Josette Cadusseau, François Renault-Mihara, et al. 2010. « CD133, CD15/SSEA-1, CD34 or Side Populations Do Not Resume Tumor-Initiating Properties of Long-Term Cultured Cancer Stem Cells from Human Malignant Glio-Neuronal Tumors ». *BMC Cancer* 10: 66. doi:10.1186/1471-2407-10-66.
- Pei, Yanxin, Colin E Moore, Jun Wang, Alok K Tewari, Alexey Eroshkin, Yoon-Jae Cho, Hendrik Witt, et al. 2012. « An Animal Model of MYC-Driven Medulloblastoma ». *Cancer Cell* 21 (2): 155-167. doi:10.1016/j.ccr.2011.12.021.
- Pelengaris, Stella, Mike Khan, et Gerard Evan. 2002. « C-MYC: More than Just a Matter of Life and Death ». *Nature Reviews Cancer* 2 (10): 764-776. doi:10.1038/nrc904.
- Pérez-Chacón, Gema, David Llobet, Constanza Pardo, José Pindado, Yongwon Choi, John C Reed, et Juan M Zapata. 2012. « TNFR-Associated Factor 2 Deficiency in B Lymphocytes Predisposes to Chronic Lymphocytic Leukemia/small Lymphocytic Lymphoma in Mice ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 189 (2): 1053-1061. doi:10.4049/jimmunol.1200814.
- Peterson, Timothy R, Mathieu Laplante, Carson C Thoreen, Yasemin Sancak, Seong A Kang, W Michael Kuehl, Nathanael S Gray, et David M Sabatini. 2009. « DEPTOR Is an mTOR Inhibitor Frequently Overexpressed in Multiple Myeloma Cells and Required for Their Survival ». *Cell* 137 (5): 873-886. doi:10.1016/j.cell.2009.03.046.
- Petros, A M, A Medek, D G Nettesheim, D H Kim, H S Yoon, K Swift, E D Matayoshi, T Oltersdorf, et S W Fesik. 2001. « Solution Structure of the Antiapoptotic Protein Bcl-2 ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (6): 3012-3017. doi:10.1073/pnas.041619798.
- Petros, A M, D G Nettesheim, Y Wang, E T Olejniczak, R P Meadows, J Mack, K Swift, et al. 2000. « Rationale for Bcl-xL/Bad Peptide Complex Formation from Structure, Mutagenesis, and Biophysical Studies ». *Protein Science: A Publication of the Protein Society* 9 (12): 2528-2534. doi:10.1110/ps.9.12.2528.

- Petros, Andrew M, Edward T Olejniczak, et Stephen W Fesik. 2004. « Structural Biology of the Bcl-2 Family of Proteins ». *Biochimica et Biophysica Acta* 1644 (2-3): 83-94. doi:10.1016/j.bbamcr.2003.08.012.
- Pfaff, Elke, Marc Remke, Dominik Sturm, Axel Benner, Hendrik Witt, Till Milde, André O von Bueren, et al. 2010. « TP53 Mutation Is Frequently Associated with CTNNB1 Mutation or MYCN Amplification and Is Compatible with Long-Term Survival in Medulloblastoma ». *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 28 (35): 5188-5196. doi:10.1200/JCO.2010.31.1670.
- Pfister, Stefan, Marc Remke, Axel Benner, Frank Mendrzyk, Grischa Toedt, Jörg Felsberg, Andrea Wittmann, et al. 2009. « Outcome Prediction in Pediatric Medulloblastoma Based on DNA Copy-Number Aberrations of Chromosomes 6q and 17q and the MYC and MYCN Loci ». *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 27 (10): 1627-1636. doi:10.1200/JCO.2008.17.9432.
- Pierceall, William E, Ryan J Lena, Bruno C Medeiros, Noel Blake, Camille Doykan, Michael Elashoff, Michael H Cardone, et Roland B Walter. 2014. « Mcl-1 Dependence Predicts Response to Vorinostat and Gemtuzumab Ozogamicin in Acute Myeloid Leukemia ». *Leukemia Research*, février. doi:10.1016/j.leukres.2014.02.007.
- Pittler, Steven J, Youwen Zhang, Shiming Chen, Alan J Mears, Donald J Zack, Zhiyong Ren, Prabodh K Swain, Suxia Yao, Anand Swaroop, et J Brandon White. 2004. « Functional Analysis of the Rod Photoreceptor cGMP Phosphodiesterase Alpha-Subunit Gene Promoter: Nrl and Crx Are Required for Full Transcriptional Activity ». *The Journal of Biological Chemistry* 279 (19): 19800-19807. doi:10.1074/jbc.M401864200.
- Pogenberg, Vivian, Larissa Consani Textor, Laurent Vanhille, Simon J Holton, Michael H Sieweke, et Matthias Wilmanns. 2014. « Design of a bZip Transcription Factor with Homo/Heterodimer-Induced DNA-Binding Preference ». *Structure (London, England: 1993)* 22 (3): 466-477. doi:10.1016/j.str.2013.12.017.
- Pollard, Steven M, Koichi Yoshikawa, Ian D Clarke, Davide Danovi, Stefan Stricker, Roslin Russell, Jane Bayani, et al. 2009. « Glioma Stem Cell Lines Expanded in Adherent Culture Have Tumor-Specific Phenotypes and Are Suitable for Chemical and Genetic Screens ». *Cell Stem Cell* 4 (6): 568-580. doi:10.1016/j.stem.2009.03.014.
- Pouponnot, C, K Sii-Felice, I Hmitou, N Rocques, L Lecoin, S Druillennec, M-P Felder-Schmittbuhl, et A Eychène. 2006. « Cell Context Reveals a Dual Role for Maf in Oncogenesis ». *Oncogene* 25 (9): 1299-1310. doi:10.1038/sj.onc.1209171.
- Pugh, Trevor J, Shyamal Dilhan Weeraratne, Tenley C Archer, Daniel A Pomeranz Krummel, Daniel Auclair, James Bochicchio, Mauricio O Carneiro, et al. 2012. « Medulloblastoma Exome Sequencing Uncovers Subtype-Specific Somatic Mutations ». *Nature* 488 (7409): 106-110. doi:10.1038/nature11329.
- Rachez, C, et L P Freedman. 2001. « Mediator Complexes and Transcription ». *Current Opinion in Cell Biology* 13 (3): 274-280.
- Rajkumar, S V, V Gupta, R Fonseca, A Dispenzieri, W I Gonsalves, D Larson, R P Ketterling, J A Lust, R A Kyle, et S K Kumar. 2013. « Impact of Primary Molecular Cytogenetic Abnormalities and Risk of Progression in Smoldering Multiple Myeloma ». *Leukemia* 27 (8): 1738-1744. doi:10.1038/leu.2013.86.
- Raum, Jeffrey C, Kevin Gerrish, Isabella Artner, Eva Henderson, Min Guo, Lori Sussel, Jonathan C Schisler, Christopher B Newgard, et Roland Stein. 2006. « FoxA2, Nkx2.2, and PDX-1 Regulate Islet Beta-Cell-Specific mafA Expression through Conserved Sequences Located between Base Pairs -8118 and -7750 Upstream from the Transcription Start Site ». *Molecular and Cellular Biology* 26 (15): 5735-5743. doi:10.1128/MCB.00249-06.
- Rausch, Tobias, David T W Jones, Marc Zapatka, Adrian M Stütz, Thomas Zichner, Joachim Weischenfeldt, Natalie Jäger, et al. 2012. « Genome Sequencing of Pediatric

- Medulloblastoma Links Catastrophic DNA Rearrangements with TP53 Mutations ». *Cell* 148 (1-2): 59-71. doi:10.1016/j.cell.2011.12.013.
- Read, Tracy-Ann, Marie P Fogarty, Shirley L Markant, Roger E McLendon, Zhengzheng Wei, David W Ellison, Phillip G Febbo, et Robert J Wechsler-Reya. 2009. « Identification of CD15 as a Marker for Tumor-Propagating Cells in a Mouse Model of Medulloblastoma ». *Cancer Cell* 15 (2): 135-147. doi:10.1016/j.ccr.2008.12.016.
- Reed, J C. 1999. « Mechanisms of Apoptosis Avoidance in Cancer ». *Current Opinion in Oncology* 11 (1): 68-75.
- Reed, John C. 2003. « Apoptosis-Targeted Therapies for Cancer ». *Cancer Cell* 3 (1): 17-22.
- Remke, Marc, Thomas Hielscher, Andrey Korshunov, Paul A Northcott, Sebastian Bender, Marcel Kool, Frank Westermann, et al. 2011. « FSTL5 Is a Marker of Poor Prognosis in Non-WNT/non-SHH Medulloblastoma ». *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 29 (29): 3852-3861. doi:10.1200/JCO.2011.36.2798.
- Reynolds, B A, et S Weiss. 1992. « Generation of Neurons and Astrocytes from Isolated Cells of the Adult Mammalian Central Nervous System ». *Science (New York, N.Y.)* 255 (5052): 1707-1710.
- Ricca, A, A Biroccio, D Del Bufalo, A R Mackay, A Santoni, et M Cippitelli. 2000. « Bcl-2 over-Expression Enhances NF-kappaB Activity and Induces Mmp-9 Transcription in Human MCF7(ADR) Breast-Cancer Cells ». *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer* 86 (2): 188-196.
- Robinson, Giles, Matthew Parker, Tanya A Kranenburg, Charles Lu, Xiang Chen, Li Ding, Timothy N Phoenix, et al. 2012. « Novel Mutations Target Distinct Subgroups of Medulloblastoma ». *Nature* 488 (7409): 43-48. doi:10.1038/nature11213.
- Rochaix, P, S Krajewski, J C Reed, F Bonnet, J J Voigt, et P Brousset. 1999. « In Vivo Patterns of Bcl-2 Family Protein Expression in Breast Carcinomas in Relation to Apoptosis ». *The Journal of Pathology* 187 (4): 410-415. doi:10.1002/(SICI)1096-9896(199903)187:4<410::AID-PATH266>3.0.CO;2-F.
- Rocques, Nathalie, Nancy Abou Zeid, Karine Sii-Felice, Laure Lecoin, Marie-Paule Felder-Schmittbuhl, Alain Eychène, et Celio Pouponnot. 2007. « GSK-3-Mediated Phosphorylation Enhances Maf-Transforming Activity ». *Molecular Cell* 28 (4): 584-597. doi:10.1016/j.molcel.2007.11.009.
- Roger, Jerome E, Jacob Nellisery, Douglas S Kim, et Anand Swaroop. 2010. « Sumoylation of bZIP Transcription Factor NRL Modulates Target Gene Expression during Photoreceptor Differentiation ». *The Journal of Biological Chemistry* 285 (33): 25637-25644. doi:10.1074/jbc.M110.142810.
- Rozenfeld-Granot, G, A Toren, N Amariglio, F Brok-Simoni, et G Rechavi. 2001. « Mutation Analysis of the FAS and TNFR Apoptotic Cascade Genes in Hematological Malignancies ». *Experimental Hematology* 29 (2): 228-233.
- Sadl, Virginia, Fuzi Jin, Joanna Yu, Shiyong Cui, Douglas Holmyard, Susan Quaggin, Greg Barsh, et Sabine Cordes. 2002. « The Mouse Kreisler (Krm1/MafB) Segmentation Gene Is Required for Differentiation of Glomerular Visceral Epithelial Cells ». *Developmental Biology* 249 (1): 16-29.
- Sakai, M, M S Serria, H Ikeda, K Yoshida, J Imaki, et S Nishi. 2001. « Regulation of c-Maf Gene Expression by Pax6 in Cultured Cells ». *Nucleic Acids Research* 29 (5): 1228-1237.
- Sato-Nishiwaki, Michiko, Yasuko Aida, Shuichi Abe, Yoko Shibata, Tomomi Kimura, Keiko Yamauchi, Hiroyuki Kishi, et al. 2013. « Reduced Number and Morphofunctional Change of Alveolar Macrophages in MafB Gene-Targeted Mice ». *PLoS One* 8 (9): e73963. doi:10.1371/journal.pone.0073963.
- Saura, Cristina, Johanna Bendell, Guy Jerusalem, Shaun Su, Qinhua Ru, Stefan De Buck, David Mills, et al. 2014. « Phase Ib Study of Buparlisib plus Trastuzumab in Patients with HER2-Positive Advanced or Metastatic Breast Cancer That Has Progressed on Trastuzumab-Based

- Therapy ». *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 20 (7): 1935-1945. doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-1070.
- Schroeder, Kristin, et Sri Gururangan. 2014. « Molecular Variants and Mutations in Medulloblastoma ». *Pharmacogenomics and Personalized Medicine* 7: 43-51. doi:10.2147/PGPM.S38698.
- Schüller, Ulrich, Vivi M Heine, Junhao Mao, Alvin T Kho, Allison K Dillon, Young-Goo Han, Emmanuelle Huillard, et al. 2008. « Acquisition of Granule Neuron Precursor Identity Is a Critical Determinant of Progenitor Cell Competence to Form Shh-Induced Medulloblastoma ». *Cancer Cell* 14 (2): 123-134. doi:10.1016/j.ccr.2008.07.005.
- Selvadurai, Hayden J, et John O Mason. 2011. « Wnt/ β -Catenin Signalling Is Active in a Highly Dynamic Pattern during Development of the Mouse Cerebellum ». *PLoS One* 6 (8): e23012. doi:10.1371/journal.pone.0023012.
- Shao, Chunli, et Melanie H Cobb. 2009. « Sumoylation Regulates the Transcriptional Activity of MafA in Pancreatic Beta Cells ». *The Journal of Biological Chemistry* 284 (5): 3117-3124. doi:10.1074/jbc.M806286200.
- Shih, David J H, Paul A Northcott, Marc Remke, Andrey Korshunov, Vijay Ramaswamy, Marcel Kool, Betty Luu, et al. 2014. « Cytogenetic Prognostication within Medulloblastoma Subgroups ». *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 32 (9): 886-896. doi:10.1200/JCO.2013.50.9539.
- Sieweke, M H, H Tekotte, J Frampton, et T Graf. 1996. « MafB Is an Interaction Partner and Repressor of Ets-1 That Inhibits Erythroid Differentiation ». *Cell* 85 (1): 49-60.
- Sii-Felice, Karine, Celio Pouponnot, Sylvie Gillet, Laure Lecoin, Jean-Antoine Girault, Alain Eychène, et Marie-Paule Felder-Schmittbuhl. 2005. « MafA Transcription Factor Is Phosphorylated by p38 MAP Kinase ». *FEBS Letters* 579 (17): 3547-3554. doi:10.1016/j.febslet.2005.04.086.
- Singh, Sheila K, Ian D Clarke, Mizuhiko Terasaki, Victoria E Bonn, Cynthia Hawkins, Jeremy Squire, et Peter B Dirks. 2003. « Identification of a Cancer Stem Cell in Human Brain Tumors ». *Cancer Research* 63 (18): 5821-5828.
- Strik, H, M Deininger, J Streffer, E Grote, J Wickboldt, J Dichgans, M Weller, et R Meyermann. 1999. « BCL-2 Family Protein Expression in Initial and Recurrent Glioblastomas: Modulation by Radiochemotherapy ». *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* 67 (6): 763-768.
- Sun, Jiying, Marjorie Brand, Yukari Zenke, Satoshi Tashiro, Mark Groudine, et Kazuhiko Igarashi. 2004. « Heme Regulates the Dynamic Exchange of Bach1 and NF-E2-Related Factors in the Maf Transcription Factor Network ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (6): 1461-1466. doi:10.1073/pnas.0308083100.
- Sun, Minghao, Petra Hillmann, Bianca T Hofmann, Jonathan R Hart, et Peter K Vogt. 2010. « Cancer-Derived Mutations in the Regulatory Subunit p85alpha of Phosphoinositide 3-Kinase Function through the Catalytic Subunit p110alpha ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (35): 15547-15552. doi:10.1073/pnas.1009652107.
- Suzuki, Atsushi, Shinsuke Iida, Miyuki Kato-Uranishi, Emi Tajima, Fenghuang Zhan, Ichiro Hanamura, Yongsheng Huang, et al. 2005. « ARK5 Is Transcriptionally Regulated by the Large-MAF Family and Mediates IGF-1-Induced Cell Invasion in Multiple Myeloma: ARK5 as a New Molecular Determinant of Malignant Multiple Myeloma ». *Oncogene* 24 (46): 6936-6944. doi:10.1038/sj.onc.1208844.
- Suzuki, M, R J Youle, et N Tjandra. 2000. « Structure of Bax: Coregulation of Dimer Formation and Intracellular Localization ». *Cell* 103 (4): 645-654.
- Swain, P K, D Hicks, A J Mears, I J Apel, J E Smith, S K John, A Hendrickson, A H Milam, et A Swaroop. 2001. « Multiple Phosphorylated Isoforms of NRL Are Expressed in Rod Photoreceptors ». *The Journal of Biological Chemistry* 276 (39): 36824-36830. doi:10.1074/jbc.M105855200.
- Swanson, Penelope J, Sheri L Kuslak, Wei Fang, Lina Tze, Patrick Gaffney, Scott Selby, Keli L Hippen, Gabriel Nunez, Charles L Sidman, et Timothy W Behrens. 2004. « Fatal Acute Lymphoblastic

- Leukemia in Mice Transgenic for B Cell-Restricted Bcl-xL and c-Myc ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 172 (11): 6684-6691.
- Swaroop, A, J Z Xu, H Pawar, A Jackson, C Skolnick, et N Agarwal. 1992. « A Conserved Retina-Specific Gene Encodes a Basic Motif/leucine Zipper Domain ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89 (1): 266-270.
- Swaroop, Anand, Douglas Kim, et Douglas Forrest. 2010. « Transcriptional Regulation of Photoreceptor Development and Homeostasis in the Mammalian Retina ». *Nature Reviews. Neuroscience* 11 (8): 563-576. doi:10.1038/nrn2880.
- Swartling, Fredrik J, Matthew R Grimmer, Christopher S Hackett, Paul A Northcott, Qi-Wen Fan, David D Goldenberg, Jasmine Lau, et al. 2010. « Pleiotropic Role for MYCN in Medulloblastoma ». *Genes & Development* 24 (10): 1059-1072. doi:10.1101/gad.1907510.
- Swartling, Fredrik J, Vasil Savov, Anders I Persson, Justin Chen, Christopher S Hackett, Paul A Northcott, Matthew R Grimmer, et al. 2012. « Distinct Neural Stem Cell Populations Give Rise to Disparate Brain Tumors in Response to N-MYC ». *Cancer Cell* 21 (5): 601-613. doi:10.1016/j.ccr.2012.04.012.
- Tagawa, Hiroyuki, Sivasundaram Karnan, Ritsuro Suzuki, Keitaro Matsuo, Xiaohua Zhang, Akinobu Ota, Yasuo Morishima, Shigeo Nakamura, et Masao Seto. 2005. « Genome-Wide Array-Based CGH for Mantle Cell Lymphoma: Identification of Homozygous Deletions of the Proapoptotic Gene BIM ». *Oncogene* 24 (8): 1348-1358. doi:10.1038/sj.onc.1208300.
- Taipale, J, et P A Beachy. 2001. « The Hedgehog and Wnt Signalling Pathways in Cancer ». *Nature* 411 (6835): 349-354. doi:10.1038/35077219.
- Takwi, Apana A L, Yan Li, Lindsey E Becker Buscaglia, Jingwen Zhang, Saibyasachi Choudhury, Ae Kyung Park, Mofang Liu, et al. 2012. « A Statin-Regulated microRNA Represses Human c-Myc Expression and Function ». *EMBO Molecular Medicine* 4 (9): 896-909. doi:10.1002/emmm.201101045.
- Taylor, G R, S Bibi, et R F Charlton. 2007. « Gene Symbol: BRCA1 ». *Human Genetics* 120 (6): 910.
- Taylor, M D, N Gokgoz, I L Andrulis, T G Mainprize, J M Drake, et J T Rutka. 2000. « Familial Posterior Fossa Brain Tumors of Infancy Secondary to Germline Mutation of the hSNF5 Gene ». *American Journal of Human Genetics* 66 (4): 1403-1406. doi:10.1086/302833.
- Taylor, Michael D, Ling Liu, Corey Raffel, Chi-chung Hui, Todd G Mainprize, Xiaoyun Zhang, Ron Agatep, et al. 2002. « Mutations in SUFU Predispose to Medulloblastoma ». *Nature Genetics* 31 (3): 306-310. doi:10.1038/ng916.
- Taylor, Michael D, Paul A Northcott, Andrey Korshunov, Marc Remke, Yoon-Jae Cho, Steven C Clifford, Charles G Eberhart, et al. 2012. « Molecular Subgroups of Medulloblastoma: The Current Consensus ». *Acta Neuropathologica* 123 (4): 465-472. doi:10.1007/s00401-011-0922-z.
- Thirant, Cécile, Barbara Bessette, Pascale Varlet, Stéphanie Puget, Josette Cadusseau, Silvina Dos Reis Tavares, Jeanne-Marie Studler, et al. 2011. « Clinical Relevance of Tumor Cells with Stem-like Properties in Pediatric Brain Tumors ». *PloS One* 6 (1): e16375. doi:10.1371/journal.pone.0016375.
- Tillmanns, Silke, Claas Otto, Ellis Jaffray, Camille Du Roure, Youssef Bakri, Laurent Vanhille, Sandrine Sarrazin, Ronald T Hay, et Michael H Sieweke. 2007. « SUMO Modification Regulates MafB-Driven Macrophage Differentiation by Enabling Myb-Dependent Transcriptional Repression ». *Molecular and Cellular Biology* 27 (15): 5554-5564. doi:10.1128/MCB.01811-06.
- Toguchida, J, T L McGee, J C Paterson, J R Eagle, S Tucker, D W Yandell, et T P Dryja. 1993. « Complete Genomic Sequence of the Human Retinoblastoma Susceptibility Gene ». *Genomics* 17 (3): 535-543. doi:10.1006/geno.1993.1368.
- Tóth-Petróczy, Agnes, Christopher J Oldfield, István Simon, Yuichiro Takagi, A Keith Dunker, Vladimir N Uversky, et Monika Fuxreiter. 2008. « Malleable Machines in Transcription Regulation: The

- Mediator Complex ». *PLoS Computational Biology* 4 (12): e1000243. doi:10.1371/journal.pcbi.1000243.
- Trudel, Suzanne, Zhi Hua Li, Jennifer Rauw, Rodger E Tiedemann, Xiao Yan Wen, et A Keith Stewart. 2007. « Preclinical Studies of the Pan-Bcl Inhibitor Obatoclox (GX015-070) in Multiple Myeloma ». *Blood* 109 (12): 5430-5438. doi:10.1182/blood-2006-10-047951.
- Tsujimoto, Y, J Yunis, L Onorato-Showe, J Erikson, P C Nowell, et C M Croce. 1984. « Molecular Cloning of the Chromosomal Breakpoint of B-Cell Lymphomas and Leukemias with the t(11;14) Chromosome Translocation ». *Science (New York, N.Y.)* 224 (4656): 1403-1406.
- Van Delft, Mark F, Andrew H Wei, Kylie D Mason, Cassandra J Vandenberg, Lin Chen, Peter E Czabotar, Simon N Willis, et al. 2006. « The BH3 Mimetic ABT-737 Targets Selective Bcl-2 Proteins and Efficiently Induces Apoptosis via Bak/Bax If Mcl-1 Is Neutralized ». *Cancer Cell* 10 (5): 389-399. doi:10.1016/j.ccr.2006.08.027.
- Van Stralen, Esther, Marc van de Wetering, Luca Agnelli, Antonino Neri, Hans C Clevers, et Bert J E G Bast. 2009. « Identification of Primary MAFB Target Genes in Multiple Myeloma ». *Experimental Hematology* 37 (1): 78-86. doi:10.1016/j.exphem.2008.08.006.
- Verhagen, A M, P G Ekert, M Pakusch, J Silke, L M Connolly, G E Reid, R L Moritz, R J Simpson, et D L Vaux. 2000. « Identification of DIABLO, a Mammalian Protein That Promotes Apoptosis by Binding to and Antagonizing IAP Proteins ». *Cell* 102 (1): 43-53.
- Vicente-Dueñas, Carolina, Isabel Romero-Camarero, Inés González-Herrero, Esther Alonso-Escudero, Fernando Abollo-Jiménez, Xiaoyu Jiang, Norma C Gutierrez, et al. 2012. « A Novel Molecular Mechanism Involved in Multiple Myeloma Development Revealed by Targeting MafB to Haematopoietic Progenitors ». *The EMBO Journal* 31 (18): 3704-3717. doi:10.1038/emboj.2012.227.
- Vikhanskaya, Faina, Ming Kei Lee, Marco Mazzeletti, Massimo Broggin, et Kanaga Sabapathy. 2007. « Cancer-Derived p53 Mutants Suppress p53-Target Gene Expression--Potential Mechanism for Gain of Function of Mutant p53 ». *Nucleic Acids Research* 35 (6): 2093-2104. doi:10.1093/nar/gkm099.
- Vinson, Charles, Max Myakishev, Asha Acharya, Alain A Mir, Jonathan R Moll, et Maria Bonovich. 2002. « Classification of Human B-ZIP Proteins Based on Dimerization Properties ». *Molecular and Cellular Biology* 22 (18): 6321-6335.
- Vucic, D, H R Stennicke, M T Pisabarro, G S Salvesen, et V M Dixit. 2000. « ML-IAP, a Novel Inhibitor of Apoptosis That Is Preferentially Expressed in Human Melanomas ». *Current Biology: CB* 10 (21): 1359-1366.
- Wajant, H, K Pfizenmaier, et P Scheurich. 2003. « Tumor Necrosis Factor Signaling ». *Cell Death and Differentiation* 10 (1): 45-65. doi:10.1038/sj.cdd.4401189.
- Wallace, V A. 1999. « Purkinje-Cell-Derived Sonic Hedgehog Regulates Granule Neuron Precursor Cell Proliferation in the Developing Mouse Cerebellum ». *Current Biology: CB* 9 (8): 445-448.
- Wang, Chunxia, Katsuhiko Hosono, Masafumi Ohtsubo, Kentaro Ohishi, Jie Gao, Nobuo Nakanishi, Akiko Hikoya, Miho Sato, Yoshihiro Hotta, et Shinsei Minoshima. 2014. « Interaction between Optineurin and the bZIP Transcription Factor NRL ». *Cell Biology International* 38 (1): 16-25. doi:10.1002/cbin.10174.
- Wang, Zhiwei, Wen Song, Amro Aboukameel, Mussop Mohammad, Guoping Wang, Sanjeev Banerjee, Dejuan Kong, Shaomeng Wang, Fazlul H Sarkar, et Ramzi M Mohammad. 2008. « TW-37, a Small-Molecule Inhibitor of Bcl-2, Inhibits Cell Growth and Invasion in Pancreatic Cancer ». *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer* 123 (4): 958-966. doi:10.1002/ijc.23610.
- Ward, Ryan J, Lilian Lee, Kevin Graham, Thevagi Satkunendran, Koichi Yoshikawa, Erick Ling, Lauren Harper, et al. 2009. « Multipotent CD15+ Cancer Stem Cells in Patched-1-Deficient Mouse Medulloblastoma ». *Cancer Research* 69 (11): 4682-4690. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-0342.

- Watson, J E Vivienne, Norman A Doggett, Donna G Albertson, Armann Andaya, Arul Chinnaiyan, Herman van Dekken, David Ginzinger, et al. 2004. « Integration of High-Resolution Array Comparative Genomic Hybridization Analysis of Chromosome 16q with Expression Array Data Refines Common Regions of Loss at 16q23-Qter and Identifies Underlying Candidate Tumor Suppressor Genes in Prostate Cancer ». *Oncogene* 23 (19): 3487-3494. doi:10.1038/sj.onc.1207474.
- Wechsler-Reya, R J, et M P Scott. 1999. « Control of Neuronal Precursor Proliferation in the Cerebellum by Sonic Hedgehog ». *Neuron* 22 (1): 103-114.
- Wende, Hagen, Stefan G Lechner, Cyril Cheret, Steeve Bourane, Maria E Kolanczyk, Alexandre Pattyn, Katja Reuter, et al. 2012. « The Transcription Factor c-Maf Controls Touch Receptor Development and Function ». *Science (New York, N.Y.)* 335 (6074): 1373-1376. doi:10.1126/science.1214314.
- Westhoff, Mike-Andrew, Shaoxia Zhou, Lisa Nonnenmacher, Georg Karpel-Massler, Claudia Jennewein, Matthias Schneider, Marc-Eric Halatsch, et al. 2013. « Inhibition of NF-κB Signaling Ablates the Invasive Phenotype of Glioblastoma ». *Molecular Cancer Research: MCR* 11 (12): 1611-1623. doi:10.1158/1541-7786.MCR-13-0435-T.
- Wetmore, C, D E Eberhart, et T Curran. 2001. « Loss of p53 but Not ARF Accelerates Medulloblastoma in Mice Heterozygous for Patched ». *Cancer Research* 61 (2): 513-516.
- Weyhenmeyer, B, A C Murphy, J H M Prehn, et B M Murphy. 2012. « Targeting the Anti-Apoptotic Bcl-2 Family Members for the Treatment of Cancer ». *Experimental Oncology* 34 (3): 192-199.
- Wong, Rebecca S Y. 2011. « Apoptosis in Cancer: From Pathogenesis to Treatment ». *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research: CR* 30: 87. doi:10.1186/1756-9966-30-87.
- Yamamoto, Tae, Motoki Kyo, Terue Kamiya, Toshiyuki Tanaka, James Douglas Engel, Hozumi Motohashi, et Masayuki Yamamoto. 2006. « Predictive Base Substitution Rules That Determine the Binding and Transcriptional Specificity of Maf Recognition Elements ». *Genes to Cells: Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms* 11 (6): 575-591. doi:10.1111/j.1365-2443.2006.00965.x.
- Yang, Ying, et Ales Cvekl. 2007. « Large Maf Transcription Factors: Cousins of AP-1 Proteins and Important Regulators of Cellular Differentiation ». *The Einstein Journal of Biology and Medicine: EJBM* 23 (1): 2-11.
- Yang, Zeng-Jie, Tammy Ellis, Shirley L Markant, Tracy-Ann Read, Jessica D Kessler, Melissa Bourboulas, Ulrich Schüller, et al. 2008. « Medulloblastoma Can Be Initiated by Deletion of Patched in Lineage-Restricted Progenitors or Stem Cells ». *Cancer Cell* 14 (2): 135-145. doi:10.1016/j.ccr.2008.07.003.
- Yoon, Joon Won, Yasuhiro Kita, Daniel J Frank, Rebecca R Majewski, Beth A Konicek, Marcelo A Nobrega, Howard Jacob, David Walterhouse, et Philip Iannaccone. 2002. « Gene Expression Profiling Leads to Identification of GLI1-Binding Elements in Target Genes and a Role for Multiple Downstream Pathways in GLI1-Induced Cell Transformation ». *The Journal of Biological Chemistry* 277 (7): 5548-5555. doi:10.1074/jbc.M105708200.
- Yoshida, Tomonori, Tsuyoshi Ohkumo, Shoko Ishibashi, et Kunio Yasuda. 2005. « The 5'-AT-Rich Half-Site of Maf Recognition Element: A Functional Target for bZIP Transcription Factor Maf ». *Nucleic Acids Research* 33 (11): 3465-3478. doi:10.1093/nar/gki653.
- Yoshida, Tomonori, et Kunio Yasuda. 2002. « Characterization of the Chicken L-Maf, MafB and c-Maf in Crystallin Gene Regulation and Lens Differentiation ». *Genes to Cells: Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms* 7 (7): 693-706.
- Youle, Richard J, et Andreas Strasser. 2008. « The BCL-2 Protein Family: Opposing Activities That Mediate Cell Death ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 9 (1): 47-59. doi:10.1038/nrm2308.

- Zhan, Fenghuang, Johanna Hardin, Bob Kordsmeier, Klaus Bumm, Mingzhong Zheng, Erming Tian, Ralph Sanderson, et al. 2002. « Global Gene Expression Profiling of Multiple Myeloma, Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance, and Normal Bone Marrow Plasma Cells ». *Blood* 99 (5): 1745-1757.
- Zhan, Fenghuang, Yongsheng Huang, Simona Colla, James P Stewart, Ichiro Hanamura, Sushil Gupta, Joshua Epstein, et al. 2006. « The Molecular Classification of Multiple Myeloma ». *Blood* 108 (6): 2020-2028. doi:10.1182/blood-2005-11-013458.
- Zhang, Chuan, Takashi Moriguchi, Miwako Kajihara, Ritsuko Esaki, Ayako Harada, Homare Shimohata, Hisashi Oishi, et al. 2005. « MafA Is a Key Regulator of Glucose-Stimulated Insulin Secretion ». *Molecular and Cellular Biology* 25 (12): 4969-4976. doi:10.1128/MCB.25.12.4969-4976.2005.
- Zhang, Yan-Jie, Qiang Dai, Dan-Feng Sun, Hua Xiong, Xiao-Qing Tian, Feng-Hou Gao, Mang-Hua Xu, Guo-Qiang Chen, Ze-Guang Han, et Jing-Yuan Fang. 2009. « mTOR Signaling Pathway Is a Target for the Treatment of Colorectal Cancer ». *Annals of Surgical Oncology* 16 (9): 2617-2628. doi:10.1245/s10434-009-0555-9.
- Zurawel, R H, C Allen, R Wechsler-Reya, M P Scott, et C Raffel. 2000. « Evidence That Haploinsufficiency of Ptch Leads to Medulloblastoma in Mice ». *Genes, Chromosomes & Cancer* 28 (1): 77-81.
- Zurawel, R H, S A Chiappa, C Allen, et C Raffel. 1998. « Sporadic Medulloblastomas Contain Oncogenic Beta-Catenin Mutations ». *Cancer Research* 58 (5): 896-899.

ANNEXE

Faible pénétrance dans le rétinoblastome: implication du gène MED4

Les outils expérimentaux que j'ai développés au cours des travaux présentés précédemment, m'ont permis de participer à un projet collaboratif avec une équipe de généticiens de l'Institut Curie, dirigée par le Dr. C. Houdayer. J'ai ainsi réalisé des approches fonctionnelles afin de valider des gènes candidats identifiés par des approches génétiques et pouvant expliquer la faible pénétrance de Rétinoblastome dans certaines familles.

1. Contexte et objectif du travail

Le rétinoblastome (RB) est une maladie rare de l'œil, survenant dans la rétine avec une incidence de 1 cas sur 15000 à 20000 naissances. Il représente la tumeur maligne intraoculaire la plus fréquente de l'enfant de moins de 5 ans. Les deux symptômes les plus fréquents révélateurs d'un rétinoblastome sont la présence d'un reflet blanc dans la pupille (leucocorie) et le strabisme. Dans les pays développés, le pronostic vital est excellent, puisque environ 95% des patients guérissent. Dans les formes graves ou traitées tardivement de RB, des métastases peuvent se former au niveau du cerveau par l'intermédiaire du nerf optique et également dans d'autres organes, par exemple dans la moelle osseuse pouvant conduire à la mort des patients. Actuellement les RB sont traités par énucléation pour les formes massives et des traitements conservateurs par chimio- ou radiothérapie pour les formes moins avancées. Ces traitements présentent des problèmes essentiellement d'ordres visuels et esthétiques, et de façon plus dramatique ils favorisent le développement de cancers secondaires. En effet, 20% à 30 % des enfants irradiés développent un sarcome, dont le pronostic vital est plus sévère. Seulement 30 % de ces patients vont guérir de leur sarcome.

Cette tumeur pédiatrique résulte de la perte des deux copies du gène suppresseur de tumeur *RBI* dans la quasi-totalité des cas (Comings 1973; Friend et al. 1986; Knudson 1971; Toguchida et al. 1993). Il existe des cas familiaux et sporadiques de ce cancer. Dans les cas familiaux, la transmission d'un allèle muté du gène *RBI* chez un individu représente une prédisposition au cancer : un sujet porteur d'une mutation du gène *RBI* a un risque supérieur à

90% de développer un rétinoblastome mais a aussi un risque accru de développer d'autres types de cancer. La transmission d'un allèle inactivé du gène *RBI* conduit au développement de rétinoblastomes multifocaux et bilatéraux dans la plupart des cas. La perte somatique du second allèle du gène *RBI* est nécessaire à la formation de rétinoblastomes. Le second événement est dans la plupart des cas une perte d'hétérozygotie conduisant à une perte bi-allélique de la région identique. D'autres événements beaucoup moins fréquents peuvent également avoir lieu comme par exemple des microdélétions. Cela a pour conséquence la perte à l'état homozygote des gènes flanquants, dans ce cas à *RBI*. Ce second événement est donc très efficace puisque plusieurs tumeurs sont présentes chez un individu. Cependant, il existe de rares cas où la transmission d'un allèle muté n'est pas associée à un risque tumoral élevé (G. R. Taylor, Bibi, et Charlton 2007). Il s'agit notamment de grandes délétions emportant l'ensemble du gène *RBI* et des gènes adjacents (Lohmann et al. 1994; Mitter et al. 2011). Les mécanismes associés à cette faible pénétrance n'étaient pas identifiés à ce jour. Nous avons émis l'hypothèse qu'il existerait un gène de survie localisé à proximité du gène *RBI* et dont la perte des deux allèles empêcherait la croissance tumorale. Des études génétiques d'une famille présentant une large délétion emportant la totalité du gène *RBI* et caractérisée par une faible pénétrance à développer un RB, couplées à une approche fonctionnelle nous conduits à proposer le gène *MED4*, comme gène potentiel de survie du RB responsable de la faible pénétrance du RB dans cette famille.

Le gène *MED4* (Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 4) code pour une sous-unité du complexe multiprotéique Mediateur. Ce complexe est constitué de 25 sous-unités réparties dans cinq domaines : la tête, le corps, la queue et le domaine kinase (Figure 23). *MED4* appartient au corps (Chadick et Asturias 2005; Tóth-Petróczy et al. 2008). Le complexe Mediateur est un acteur clé de la transcription. Il intègre différents signaux et fait le lien entre les facteurs de transcription et la machinerie générale de transcription permettant ainsi le recrutement de l'ARN polymérase 2 (Rachez et Freedman 2001). Le rôle de *MED4* est encore peu connu, mais son implication dans un complexe majeur de la transcription laisse présager que la délétion de *MED4* serait délétère pour les cellules. Ainsi la perte de *MED4* associée à l'inactivation de *RBI*, conduirait à la mort des cellules tumorales.

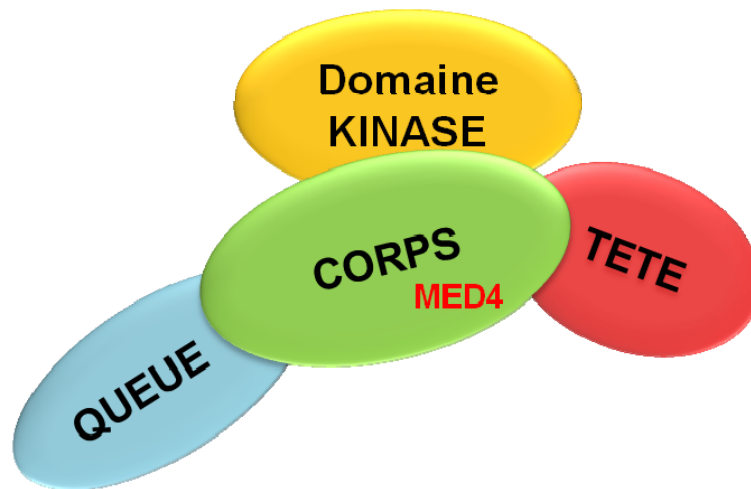


FIGURE 23 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA STRUCTURE DU COMPLEXE MEDIATEUR.

Le complexe Mediateur est constitué de 25 sous-unités réparties en 4 domaines distincts : la tête (rouge), le corps (vert)/ la queue (bleu) et le domaine kinase additionnel (jaune). MED4 est une sous-unité localisée dans le corps du complexe.

2. Identification de gènes candidats

L'analyse génétique réalisée par l'équipe de C. Houdayer est basée sur l'étude d'une famille présentant une faible pénétrance du RB. Au sein de cette famille trois individus portent la même altération du gène RB1, une délétion complète, tandis que seulement un individu a développé un RB, illustrant cette faible pénétrance du RB. Chez cet individu, le second allèle RB1 n'est pas perdu, mais présente une mutation non sens. Il a donc été proposé que le « gène de survie » potentiel soit localisé dans la région perdue et contigüe au gène RB1. Les différentes analyses génétiques leur ont permis de proposer deux gènes candidats, *MED4* et *NUDT15*, dont l'un serait essentiel à la survie et la croissance des cellules. Dans un second temps, nous avons validé fonctionnellement ces « gènes de survie » potentiels dans le RB.

3. Validation fonctionnelle du gène MED4

Des analyses génétiques nous ont permis d'identifier les gènes *NUDT15* et *MED4* comme gènes candidats pour expliquer la faible pénétrance. Afin de déterminer si ces deux gènes sont

indispensables à la survie et à la croissance de cellules de RB, nous avons réalisé une approche par perte de fonction, en utilisant des shARN spécifiques de MED4 ou NUDT15 dans deux lignées cellulaires de RB, les cellules Y79 et WERI-1B. Ces lignées étant non transfectables, ces expériences ont été réalisées par des approches lentivirales. *In vitro*, nous avons montré que l'extinction de l'expression de *NUDT15* n'affecte ni la survie des cellules, ni leur croissance. A l'inverse la perte de MED4 induit une mort massive des cellules, par apoptose en accord avec une diminution de la prolifération et affecte les propriétés transformées de ces cellules. *In vivo*, l'extinction de *MED4* a pour conséquence une diminution de la croissance tumorale de ces cellules, greffées en intraoculaire. Ces données valident fonctionnellement que *MED4* est essentiel à la survie des cellules de RB dans lesquelles le gène *RBI* est inactivé et que la perte bi-allélique de ce gène ne peut pas avoir lieu dans ces cellules.

Cette étude permet de résoudre une énigme médicale, en apportant une explication à la faible pénétrance du RB au sein de familles, qui présentent pourtant une délétion complète du gène *RBI*. MED4 est un composant essentiel du complexe Mediateur. La perte de MED4 pourrait déstabiliser ce complexe et induire la mort des cellules. L'identification d'altérations germinales du gène MED4 pourrait être utilisée comme marqueurs pronostiques pour les formes héréditaires de RB. Ainsi, des individus porteurs d'une grande délétion du RB1 incluant le gène MED4 seraient moins susceptibles de développer un RB et pourraient bénéficier d'un suivi ophtalmologique moins contraignant.

Ce travail a été réalisé au sein du projet incitatif et collaboratif sur le rétinoblastome à l'Institut Curie et fait l'objet d'un article dans Human Molecular Genetics dont je suis co-première auteur.

C.Dehainault*, **A.Garancher***, L.Castera, N.Cassoux, I.Aerts, F.Doiz, L.Desjardins, L.Lumbroso, R.Montes de Oca, G.Almouzni, D.Stoppa-Lyonnet, C.Pouponnot, M.Gauthier-Villars, C.Houdayer. The survival gene MED4 explains low penetrance retinoblastoma in patients with large RB1 deletion, HMG

* co-premier auteur

Références bibliographiques

- Chadick, James Z, et Francisco J Asturias. 2005. « Structure of Eukaryotic Mediator Complexes ». *Trends in Biochemical Sciences* 30 (5): 264-271. doi:10.1016/j.tibs.2005.03.001.
- Comings, D E. 1973. « A General Theory of Carcinogenesis ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 70 (12): 3324-3328.
- Friend, S H, R Bernards, S Rogelj, R A Weinberg, J M Rapaport, D M Albert, et T P Dryja. 1986. « A Human DNA Segment with Properties of the Gene That Predisposes to Retinoblastoma and Osteosarcoma ». *Nature* 323 (6089): 643-646. doi:10.1038/323643a0.
- Knudson, A G, Jr. 1971. « Mutation and Cancer: Statistical Study of Retinoblastoma ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 68 (4): 820-823.
- Lohmann, D R, B Brandt, W Höpping, E Passarge, et B Horsthemke. 1994. « Distinct RB1 Gene Mutations with Low Penetrance in Hereditary Retinoblastoma ». *Human Genetics* 94 (4): 349-354.
- Mitter, Diana, Reinhard Ullmann, Artur Muradyan, Ludger Klein-Hitpass, Deniz Kanber, Katrin Ounap, Marc Kaulisch, et Dietmar Lohmann. 2011. « Genotype-Phenotype Correlations in Patients with Retinoblastoma and Interstitial 13q Deletions ». *European Journal of Human Genetics: EJHG* 19 (9): 947-958. doi:10.1038/ejhg.2011.58.
- Rachez, C, et L P Freedman. 2001. « Mediator Complexes and Transcription ». *Current Opinion in Cell Biology* 13 (3): 274-280.
- Taylor, G R, S Bibi, et R F Charlton. 2007. « Gene Symbol: BRCA1 ». *Human Genetics* 120 (6): 910.
- Toguchida, J, T L McGee, J C Paterson, J R Eagle, S Tucker, D W Yandell, et T P Dryja. 1993. « Complete Genomic Sequence of the Human Retinoblastoma Susceptibility Gene ». *Genomics* 17 (3): 535-543. doi:10.1006/geno.1993.1368.
- Tóth-Petróczy, Agnes, Christopher J Oldfield, István Simon, Yuichiro Takagi, A Keith Dunker, Vladimir N Uversky, et Monika Fuxreiter. 2008. « Malleable Machines in Transcription Regulation: The Mediator Complex ». *PLoS Computational Biology* 4 (12): e1000243. doi:10.1371/journal.pcbi.1000243.

ARTICLE 3

The survival gene MED4 explains low penetrance retinoblastoma in patients with large RB1 deletion

C.Dehainault*, **A.Garancher***, L.Castera, N.Cassoux, I.Aerts, F.Doiz, L.Desjardins, L.Lumbroso, R.Montes de Oca, G.Almouzni, D.Stoppa-Lyonnet, C.Pouponnot, M.Gauthier-Villars, C.Houdayer.

* co-premier auteur

Human Molecular Genetics, Mai 2014

The survival gene *MED4* explains low penetrance retinoblastoma in patients with large *RB1* deletion

Catherine Dehainault^{1,†}, Alexandra Garancher^{2,8,9,10,†}, Laurent Castéra¹, Nathalie Cassoux^{4,11}, Isabelle Aerts³, François Doz^{3,7}, Laurence Desjardins⁴, Livia Lumbroso⁴, Rocío Montes de Oca⁵, Geneviève Almouzni⁵, Dominique Stoppa-Lyonnet^{1,6,7}, Celio Pouponnot^{2,8,9,10,‡,*}, Marion Gauthier-Villars¹ and Claude Houdayer^{1,6,7,*}

¹Service de Génétique, Institut Curie, Paris, France, ²Institut Curie, Section Recherche, Orsay, France, ³Département d'oncologie pédiatrique, adolescents jeunes adultes and ⁴Département d'oncologie chirurgicale, service d'Ophtalmologie, Institut Curie, Paris, France, ⁵Institut Curie, CNRS UMR 3664, Paris, France, ⁶INSERM U830, centre de recherche de l'Institut Curie, Paris, France, ⁷Université Paris Descartes, Sciences pharmaceutiques et biologiques, Sorbonne Paris Cité, Paris, France, ⁸CNRS UMR3347, ⁹INSERM U1021, ¹⁰Université Paris Sud and ¹¹Laboratoire d'Investigation Préclinique, Institut Curie, Paris, France

Received April 15, 2014; Revised May 14, 2014; Accepted May 16, 2014

Retinoblastoma is a non-hereditary as well as an inherited pediatric tumor of the developing retina resulting from the inactivation of both copies of the *RB1* tumor suppressor gene. Familial retinoblastoma is a highly penetrant genetic disease that usually develops by carrying germline mutations that inactivate one allele of the *RB1* gene, leading to multiple retinoblastomas. However, large and complete germline *RB1* deletions are associated with low or no tumor risk for reasons that remain unknown. In this study, we define a minimal genomic region associated with this low penetrance. This region encompasses few genes including *MED4* a subunit of the mediator complex. We further show that retinoblastoma *RB1* $-/-$ cells cannot survive in the absence of *MED4*, both *in vitro* and in orthotopic xenograft models *in vivo*, therefore identifying *MED4* as a survival gene in retinoblastoma. We propose that the contiguous loss of the adjacent retinoblastoma gene, *MED4*, explains the low penetrance in patients with large deletions that include both *RB1* and *MED4*. Our findings also point to another synthetic lethal target in tumors with inactivated *RB1* and highlight the importance of collateral damage in carcinogenesis.

INTRODUCTION

Retinoblastoma (Rb) is an inherited as well as a non-hereditary disease. It represents the most common pediatric intraocular neoplasm, which in virtually every case results from the inactivation of both alleles of the *RB1* tumor suppressor gene (MIM *614041) in the developing retina (1–4).

In non-hereditary Rb, both somatic mutations in *RB1* take place in a single retinal cell that develops into a tumor. In contrast, in hereditary Rb germline mutations of one *RB1* allele are associated with predisposition to Rb. Tumor development is initiated by a second somatic inactivating mutation in retinal cell(s) and

usually consists of loss of the second allele, demonstrated by loss of heterozygosity (LOH) studies. Predisposition to Rb usually segregates as an autosomal dominant trait with high penetrance (90%), and it is widely recognized that germline carriers develop unilateral multifocal or bilateral Rb. However, rare instances of familial Rb displaying low penetrance (LP) and variable expressivity have been described (5). In such families, mutation carriers develop unilateral, unifocal Rb (reduced expressivity) or remain unaffected (reduced penetrance). The underlying molecular mechanisms leading to LP in Rb are poorly understood. In addition, the existence of modifier factors influencing the clinical expression must be considered, given that an identical mutation can

*To whom correspondence should be addressed at: for CH Service de Génétique, INSERM U830, Institut Curie, 75005 Paris et Université Paris Descartes, Sciences pharmaceutiques et biologiques, Sorbonne Paris Cité, Paris, France. Tel: +33 1 44 32 41 17; Fax: +33 1 53 10 26 48; Email: claud.houdayer@curie.fr. For CP: UMR3347/U1021, Institut Curie, Bât110 Centre Universitaire, 91405 Orsay Cedex France. Tel: +33 1 69 86 30 79; Fax: +33 1 69 86 30 51; Email: celio.pouponnot@curie.fr

[†]The authors wish it to be known that, in their opinion, the first two authors should be regarded as joint first authors.

[‡]CH and CP should be regarded as joint senior authors.

result in heterogeneous phenotypes within a single family. The most famous example was first described a quarter of a century ago by Bunin *et al.* (6), who found that patients with germline chromosomal deletions of *RB1* were more prone to unilateral Rb compared with other patients with hereditary Rb that usually developed bilateral Rb. Later studies demonstrated that although Rb arises as a result of loss-of-function mutations, large germline deletions encompassing the entire *RB1* locus could be associated with low or no tumor risk. This paradox has never been explained. One hypothesis is that large deletions may encompass an unknown contiguous gene (called ‘survival gene’ hereafter) absolutely required for Rb progression. As the second hit involves very often LOH, this will result on bi-allelic loss of the *RB1* gene as well as of this putative ‘survival gene’ preventing Rb development (hence low expressivity and penetrance). In families bearing such large deletions, Rb could only arise from a second hit involving *RB1* point mutations or intragenic deletions but excluding this potential ‘survival gene’.

To test the ‘survival gene’ hypothesis, we focused on a family presenting LP, with an unaffected father and daughter but a bilaterally affected son, all three of whom presented a complete and large deletion of the *RB1* gene. Following deletion mapping approaches and functional testing, *MED4* (MIM *605718), a key subunit of the mediator complex, was identified as the ‘survival gene’ explaining the low disease penetrance observed in this family. The demonstration that Rb *RB1* $-/-$ cells cannot survive in the absence of *MED4* solves an old medical enigma and extends well beyond the Rb field as this ‘survival gene’ mechanism echoes with synthetic lethality and collateral damage processes recently demonstrated in glioblastoma (7,8). Our findings also provide with additional gene or drug targets for the treatment of Rb.

RESULTS

The Institut Curie is a reference center for Rb management in France, providing remarkable homogeneity in the clinical and genetic management of patients with familial Rb. All patients were identified and followed exclusively at this center, thereby offering reliable clinical and biological information. Familial and non-familial cases of Rb harboring a complete *RB1* deletion were collected. We focused on a particular Rb family (Fig. 1) because it underlines the importance of genetic modifiers in the development of Rb, and also illustrates how LP associated to complete *RB1* deletions might occur. Three individuals in this family carry the same alteration of the *RB1* gene, a complete deletion, while only one individual developed Rb. Fundus examination in the two unaffected relatives showed no sign of regressed Rb or retinoma. We characterized the second hit mutation in the Rb patient; the bilaterally affected child did not display LOH nor a large deletion of the *RB1* gene but a distinct second causative mutation, an intragenic *RB1* nonsense point mutation p.(Arg556Ter). As this family is characterized by a complete *RB1* gene deletion and two relatives present no expression of the disease (no tumor) while the affected son displays an intragenic mutation as a second hit, the deleted interval in this family might contain a putative ‘survival gene’ that explains the low familial penetrance.

We mapped and sequenced the breakpoints of the deleted interval in this family using a combination of high-resolution

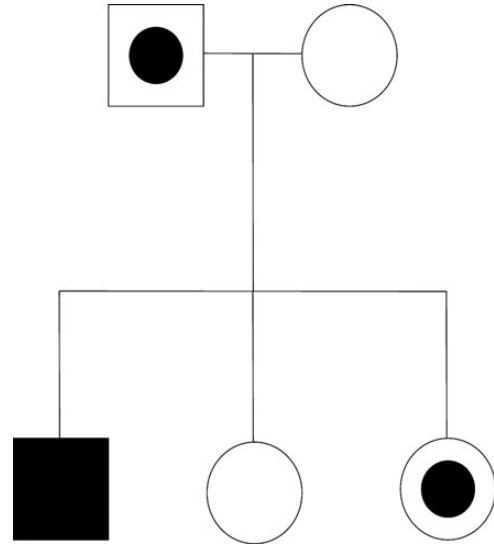


Figure 1. Pedigree of a family showing LP Rb. Family with an unaffected father and daughter and a bilaterally affected son, all three present a complete deletion of the *RB1* gene. Black square: bilaterally affected boy; circle and square with a black dot: unaffected carriers of the complete *RB1* deletion.

comparative genomic hybridization (CGH) arrays and multiplex PCR/liquid chromatography assays, focusing on the *RB1* locus. The same approach was performed in six bilaterally affected Rb patients harboring a complete germline *RB1* deletion. Comparisons of the deleted intervals between affected and unaffected cases helped to define the critical germline interval containing the putative ‘survival gene’. By definition, the putative ‘survival gene’ needs to be expressed for the tumor to develop; hence, at least one copy of the gene must be retained in the tumor. We therefore examined six tumors carrying two full *RB1* deletions in order to refine the location of the gene by subsequent CGH array analysis (Fig. 2). We compared the mapped germline and somatic intervals that included or excluded the gene, respectively. The telomeric interval was completely lost in two tumors (3 and 5) and was thereby excluded, whereas the centromeric interval was refined to genomic coordinates 47 573 600–45 962 864 due to the large deletion observed in tumor 3 (Fig. 2). The centromeric interval contained six genes: *ESD*, *SUCLA2*, *NUDT15*, *MED4*, *HTR2A* and *LRCH1*, none of which represented an obvious candidate for the ‘survival gene’.

To further narrow down the number of candidate genes, we studied the expression of each gene in the Y79 Rb cell line, using normal retina and other tissues (Burkitt’s lymphoma, thyroid) as controls. The rationale was that the putative ‘survival gene’ should be expressed in the Rb cell line. All genes were expressed in the normal retina; however, *HTR2A* was eliminated due to its lack of expression in Y79 cells. Considering the available literature reporting genotype-phenotype correlations in Rb patients with 13q deletions (9), *MED4* and *NUDT15* stood out as potential candidates as the other genes were apparently not included in the deletion intervals linked to a LP phenotype.

To determine whether Rb requires one of these two candidate genes for its growth, we conducted loss-of-function experiments using RNA interference in Rb cell lines. We successfully identified short hairpin RNAs (shRNAs) (two for each gene) that efficiently downregulated the expression of *MED4* (Fig. 3A) and

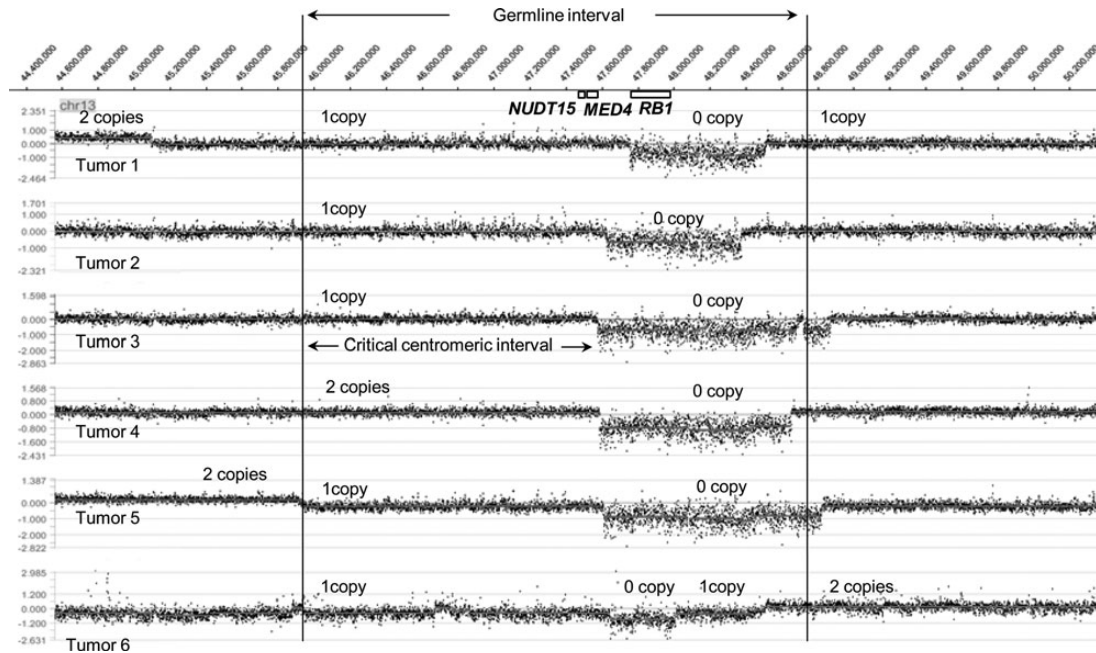


Figure 2. Definition of the centromeric critical interval in Rb patients. CGH array profiles are shown for six tumors containing a full *RB1* deletion. X-axis: genomic location; y-axis: signal intensity. Copy numbers are indicated above the signal traces. Location of *RB1*, *MED4* and *NUDT15* is indicated by a box (Hg18 build). The critical germline interval defined in the LP family (see text) is indicated by two vertical lines. The centromeric critical interval was defined by subtracting the homozygous deleted parts of the locus (0 copy) from the germline interval.

NUDT15 (Supplementary Material, Fig. S1A and B) as measured by reverse transcription-quantitative real-time PCR (RT-qPCR) and western blot (WB). The lack of a suitable *MED4* commercial antibody precluded the analysis of *MED4* protein levels by WB. Knockdown of *NUDT15* in Y79 Rb cells did not induce apoptosis (Supplementary Material, Fig. S1C) or affect proliferation (Supplementary Material, Fig. S1D), indicating that *NUDT15* was not essential for Rb development under our assay conditions. Therefore, we excluded *NUDT15* as a potential 'survival gene' in Rb. In contrast, shRNA-mediated *MED4* downregulation significantly induced apoptosis both in Y79 and WERI-Rb-1RB cell lines compared with shRNA controls (Fig. 3B), as measured by FACS analysis of cleaved Caspase-3. Accordingly, we also observed a marked decrease in cell proliferation in *MED4* knockdown cells using both shMED4 (Fig. 3C). We then performed clonogenic assays under semi-solid conditions. While Y79 and WERI-Rb-1 control cells formed many colonies, *MED4* knockdown cells formed significantly fewer, if any colonies (Fig. 3D), indicating that *MED4* is necessary for Rb anchorage independent growth, a major characteristic of transformed cells.

To verify and test in a more physiologically relevant assay our *in vitro* results we performed *in vivo* orthotopic grafting experiments using 15 non-obese diabetic-severe combined immunodeficient mice (NOD-SCID). The right eye of each mouse was injected with control Y79 (shControl) or *MED4* knockdown Y79 (shMED4#1 and #2) cells. Ophthalmic examination showed that Y79 xenografts started to grow at Week 3 after injection (Fig. 4). At Week 7, retinal tumors with or without vitreous involvement were present in all mice bearing control Y79 xenografts (ShCtl; 5/5). In contrast, vitreous involvement was present only in one mouse bearing the shMED4#1 xenograft

cells (1/5) and in none of the mice bearing the shMED4#2 xenograft cells (Table 1). Fibrosis without any sign of active tumor was noted in 3/10 mice bearing shMED4 xenografts (two in shMED4 #1 and one in shMED4 #2).

Histologic analysis confirmed the ophthalmic examination results (Supplementary Material, Fig. S2). All mice injected with Y79 control xenografts developed tumors in their eye. Retinal and vitreous infiltration was composed of small to medium size cells with scanty cytoplasm, and hyperchromatic nuclei with mitotic cells. No rosette or fleurette were observed. More than 95% of cells were Ki positive. For mice bearing shMED4 xenografts, histological examination revealed eyes free of tumors in 4/5 mice for shMED4#1 and 5/5 mice for shMED4#2.

Overall, our results show that Rb *RB1* $-/-$ cells cannot survive in the absence of *MED4* *in vitro* and in orthotopic xenograft models *in vivo*, therefore identifying *MED4* as a survival gene in Rb.

DISCUSSION

Although Rb remains the prototype of inherited cancer, the molecular bases of LP are yet to be explained. LP mutations appear to reduce, but not eliminate pRB activity (i.e. so-called weak alleles) (10,11). In addition, other factors such as the *MDM2* gene and imprinting have been described to modulate the Rb phenotype (12,13). Identifying these modifiers is of utmost importance, as it will clearly help elucidate prognosis for individual mutation carriers, and allow their optimal genetic counseling, and planning of ophthalmologic surveillance. At last, therapeutic opportunities may emerge from these efforts.

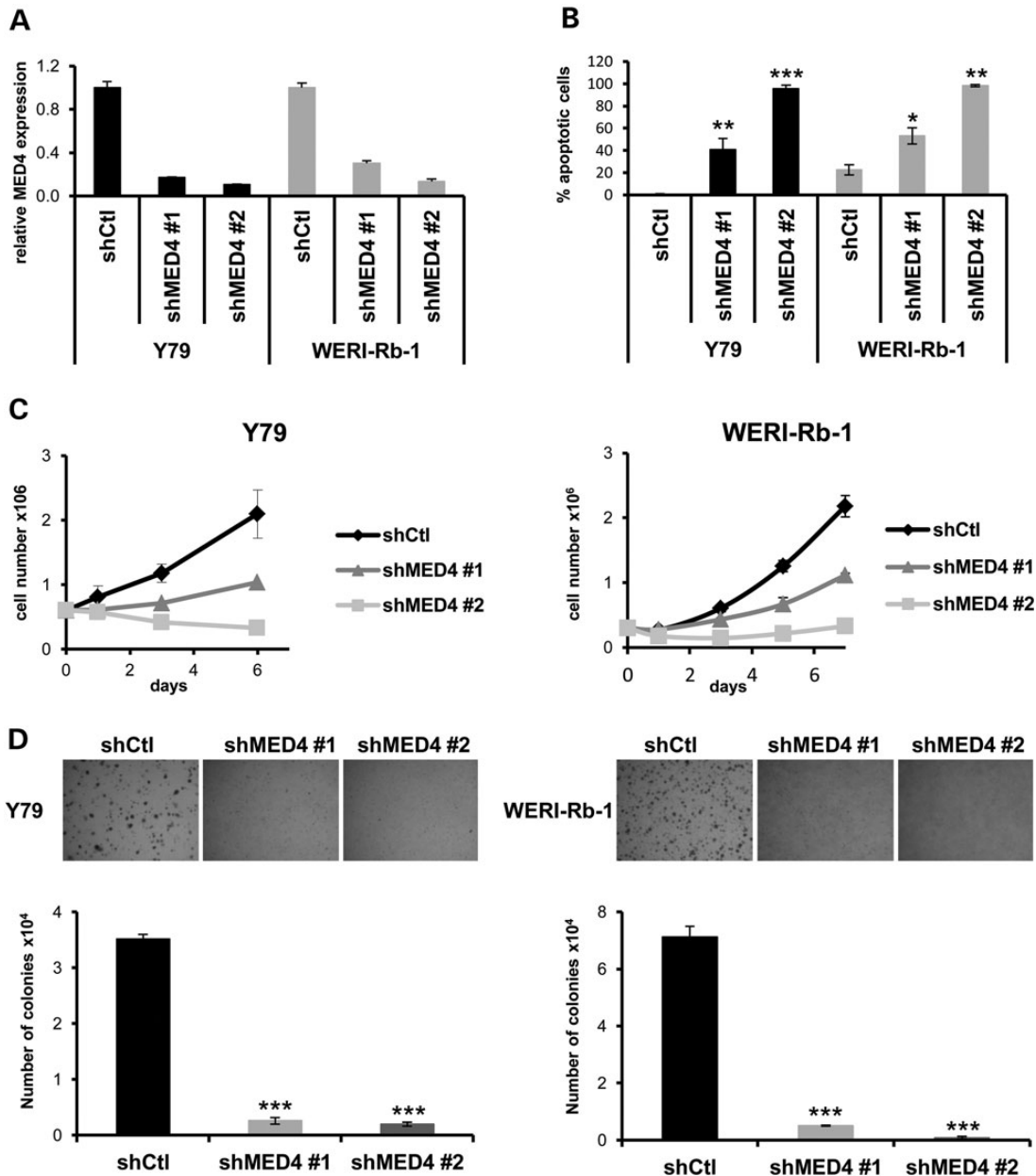


Figure 3. Loss of MED4 induces cell death, decreases colony formation and tumorigenicity in Rb cell lines. (A) Relative *MED4* expression in Y79 (black) and WERI-Rb-1 (grey) cells treated with a control shRNA (shCtl) or a *MED4* shRNA (shMED4#1 and #2) as determined by RT-qPCR. *GAPDH* was used as housekeeping gene. (B) Percent of apoptosis in Y79 (black) and WERI-Rb-1 (grey) cells expressing control (shCtl) or *MED4* (shMED4#1 and #2) shRNAs, analyzed by FACS and a cleaved caspase 3 antibody. * $P < 0.05$, ** $P < 0.005$, *** $P < 0.0005$. (C) Growth curves of control (shCtl, black) or *MED4* knockdown (shMED4 #1 and #2, grey) Y79 and WERI-Rb-1 cells performed by counting cells after shRNA infection. (D) Phase-contrast images of colony formation assays in soft agar for shRNA control (shCtl) or *MED4* knockdown (shMED4 #1 and #2) cells. Colony numbers were quantified by the Image J software and plotted for shCtl (black) and shMED4 #1 and #2 (grey) cells. *** $P < 0.0005$.

Hence, deciphering the link between LP and complete *RBI* deletions should not only solve an old medical enigma but also provide major clues in genotype/phenotype correlations, tumor progression, and possibly point to novel therapeutic targets.

In this study, we moved from clinical observations to functional approaches. Based on an Rb family with LP ascertained in the clinics, germline and tumoral mapping studies identified two adjacent 'survival' candidates, *MED4* (as cited above) and *NUDT15*. Following functional testing we demonstrated that

Rb *RBI* $-/-$ cells cannot tolerate the homozygous loss of *MED4*, thereby explaining the LP observed in patients with large *RBI* deletions. *MED4*, also known as *TRAP36* and/or *DRIP36*, is a subunit of the mediator complex that connects gene-specific transcription factors and the polymerase II machinery (14). *MED4* exhibits strong conservation across species, suggestive of an important but yet to be characterized biological function within the mediator complex. Together with other subunits, *MED4* constitutes the middle part of the complex (15),

which is found in nearly all mediator preparations. It is thus possible that *MED4* plays a structural role within this complex, and its loss may affect all the activities of the complex. Previously, several mediator subunits were shown to be involved in cancer development. For example, *MED1* contributes to ER α -dependent breast cancer by bridging ER α nuclear receptors to the Pol-II machinery. Additionally, *MED1* overexpression was also observed in this type of cancer due, in some cases, to its amplification (16). Accordingly, silencing *MED1* in breast cancers decreased tumor growth and sensitized tumor cells to anti-estrogen treatment (17). Interestingly, *MED13L* is required for Rb/E2F control cell growth and cell cycle inhibition (18). Little is known about *MED4* involvement in tumorigenesis; one study associated its loss and downregulation with poor clinical outcome in cervical cancer and proposed *MED4* as a driver of chemoradioresistance possibly via its transactivation of the vitamin D receptor (19). Similarly, it has been demonstrated

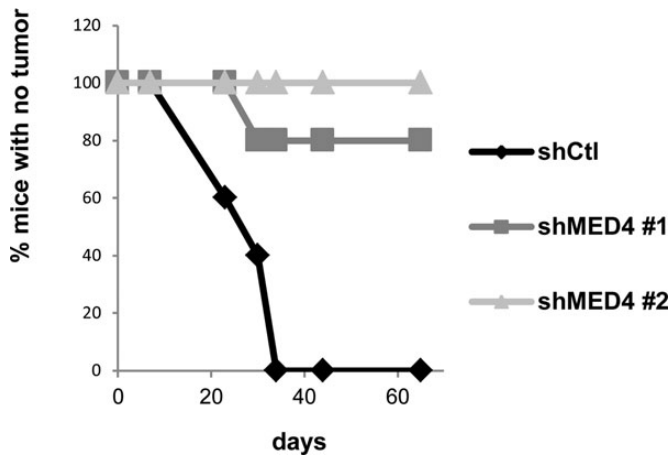


Figure 4. Loss of *MED4* in Y79 xenograft cells reduces their tumorigenicity. Ophthalmic examination of mice subjected to intraocular injection was performed every week until their sacrifice. The graph shows the percentage of tumor free mice injected with control cells (ShCtl; black) or *MED4* knockdown cells (shMED4 #1 and #2; grey).

that the vitamin D active metabolite (1,25-dihydroxyvitamin D3) induces apoptosis in Rb cell lines, albeit at high doses, precluding its use in clinical practice (20). As *MED4* might be a core subunit of the mediator complex, one might wonder if the survival mechanism is specific to *RBI* KO cells or a general survival mechanism (i.e., *MED4* expression would be necessary for any cell to survive). *MED4* is indeed ubiquitously expressed to varying degrees in cells and tissues and appears highly expressed in several types of cancer (21). However, a germline homozygous frameshift mutation was reported in 16 individuals among 6259 genotypes from the Exome Variant Server (<http://eversusgs.washington.edu/EVS/>). This suggests that *MED4* is not a 'global survival gene' and may indicate that in some contexts cells can survive the absence of *MED4*. Regardless, our results show that *MED4* is required for Rb development.

Recently, a subset of genes that are essential to all cells named CYCLOPS (Copy number alterations Yielding Cancer Liabilities Owing to Partial loss) was described (22). Partial but not complete suppression of CYCLOPS genes is compatible with cancer cell viability. This study and our findings strongly suggest that this survival mechanism is a general concept. Also interesting is the close localization of a recessive tumor suppressor gene and a survival gene such as the one demonstrated in our study. We wonder if this closeness occurred by chance alone or by a common, possibly protective, mechanism. The latter hypothesis might be supported by a recent study demonstrating that most somatic homozygous deletions encompassing recessive cancer genes (such as *RBI*) are composed of a large deletion on one parental chromosome and a small deletion on the other (23). The size of these small deletions might actually be dictated by the presence of neighboring survival genes. In other words, homozygous deletions in cancer extend until involvement of survival genes, which might in turn represent one of the shaping forces of the tumor genome.

Our findings underline the importance of collateral damage in cancer, further highlighting that passenger deleted genes encoding essential activities could be a therapeutic target of choice (8). In this line, *MED4* is another synthetic lethal target in tumors with inactivated *RBI*. Importantly, our shRNA inhibition experiments

Table 1. Ophthalmological examination of 15 NOD-SCID immunodeficient mice following orthotopic grafting experiments

	No. mouse	Week							Tumor localization
		1	2	3	4	5	6	7	
shCtl	1	-	-	-	+	+	+	+++	Retina/vitreous
	2	-	-	-	-	+	+	++	Retina
	3	-	-	++	++	++	+++	+++	Vitreous
	4	-	-	-	-	+	+	++++	Retina/vitreous
	5	-	-	++	++	++	++	++	Retina
shMED4 #1	6	-	-	-	-	-	Fibrosis	Fibrosis	Fibrosis
	7	-	-	-	-	Fibrosis	Fibrosis	Fibrosis	
	8	-	-	-	-	-	-	-	
	9	-	-	-	+	++	++	++	Vitreous
shMED4 #2	10	-	-	-	-	-	-	-	
	11	-	-	-	-	-	-	-	
	12	-	-	-	-	-	-	-	
	13	-	-	-	-	-	-	-	
	14	-	-	-	Fibrosis	Fibrosis	Fibrosis	Fibrosis	
	15	-	-	-	-	-	-	-	

Tumor involvement is described as (+) = mild, (++) = moderate to severe and (+++) = massive; (-): no tumor.

demonstrated growth arrest in our mouse model, paving the way for future clinical trials. Lastly, it should be determined if *MED4* germline mutations are involved in Rb phenotypic variability and eventually be used as prognostic biomarkers.

MATERIALS AND METHODS

Patients

Diagnosis of Rb was established on the basis of examinations by an ophthalmologist and by histopathological criteria when the tumor was available. Rb patients were offered genetic counseling and individual written consent was obtained from all sampled individuals or their legal guardians. In this series of 1210 consecutively ascertained cases, a total of 11 and 30 patients were diagnosed with a complete deletion of the *RB1* gene at the germline or tumoral only levels, respectively. The six tumors described are from unilateral sporadic cases and were selected for the study as they showed the largest homozygous deleted intervals among our series.

CGH array and multiplex PCR/liquid chromatography

A dedicated CGH-array focusing on the *RB1* locus was used to restrict the extent of deletions to ~100 kb, according to the manufacturer's instructions (Roche Nimblegen, Madison, WI, USA). The multiplex PCR/liquid chromatography method was used to restrict the size of breakpoint regions. Multiple small genomic regions of 200–300 bp were co-amplified using unlabeled primers, and PCR products were then separated by ion-pair reversed-phase high-performance liquid chromatography and quantified by fluorescent detection using a post-column intercalation dye. The relative peak intensities for each target directly reflect the copy number of each region studied. By choosing, step by step, a set of 20 couples of primers to study the breakpoint regions, their size was able to be restricted to ~5 kb. A long-range PCR was performed in each case, using the forward primer of the most centromeric undeleted PCR fragment of the centromeric breakpoint region, and the reverse primer of the most telomeric undeleted PCR fragment of the telomeric breakpoint region. Both fragments were directly sequenced on both strands in order to define the deletion breakpoints at the nucleotide level (24,25).

Expression studies

Expression levels of the six candidate genes were studied in the Y79 Rb cell line and control RNAs. As a preliminary step, we first verified that Y79 and human Rb tumors presented similar CGH pangenomic profiles and identified the two *RB1* loss-of-function mutations in Y79 cells (c.2106+1G>A and a large deletion from exons 2 to 6) in order to validate the model. Control RNAs were chosen in order to display a high level of expression of the candidate genes and were derived from a Burkitt's lymphoma (GA-10- ATCC number CRL-2392, ATCC, Manassas, VA, USA), human thyroid (Human Thyroid polyA RNA no. 636128 batch 7110100, Clontech, Mountain View, CA, USA) and human retina (Human Retina total RNA no. 636579 batch 1005010, Clontech). TaqMan probes (assays on demand, Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) were designed for each gene and two housekeeping genes (TBG and POLG). RT-PCRs were

performed in duplicate with the applied PCR core kit and random hexamers on a Taqman 7900 (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). Relative expression (r) was calculated as follows $r = 2 [- (\Delta Ct \text{ Gene of interest} - \Delta Ct \text{ Reference Gene})]$.

Cell culture

The Y79 and WERI-Rb-1 Rb cell lines (ATCC) were cultured in RPMI 1640 medium (GIBCO), supplemented with 10% (WERI-Rb-1) or 20% (Y79) fetal bovine serum (GIBCO), 100 units/ml penicillin, and 100 μ g/ml streptomycin (Invitrogen), 1.25 μ g/ml fungizone (Invitrogen), at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. As WERI-Rb-1 cell line is known to carry a whole *RB1* deletion, we demonstrated by multiplex ligation probe amplification and CGH analyses that the other copy was retained in the tumor. As a result, at least one *MED4* copy also remains, in accordance with our model.

shRNA and lentiviral production and infection

Lentiviral pLKO vectors encoding shRNA targeting *NUDT15* (NM_018283, clones TRCN0000289456, TRCN0000289457) and *MED4* (NM_014166, clones TRCN0000353703, TRCN0000330941) were obtained from Sigma-Aldrich. Lentiviruses were produced in 293T cells, by co-transfecting pLKO-derived vectors and the packaging plasmids pS-PAX2 and pMD2-VSVG, using lipofectamine 2000 (Invitrogen). Lentiviral particles were harvested 48, 60 and 72 h post-transfection. 2×10^6 Y79 and WERI (26)-Rb-1 cells were infected and selected with puromycin (1 μ g/ml).

Real-time RT-PCR

Total RNA, extracted using RNeasy Plus mini kit (Qiagen), was reversely transcribed with the Cloned AMV First-Strand cDNA Synthesis Kit (Invitrogen). Quantitative real-time PCR assays were conducted using SYBR Green real-time PCR Master Mix and real-time PCR amplification equipment (Applied). The primer sequences were: sense, 5'-ATTGCCAGATGTCCTTG CTC-3' and antisense, 5'-CCAGGAGGTTCCAACAAAAA-3' for *MED4* (105 bp); sense, 5'-AAGTTGGGAGTGGGTTCC TT-3' and antisense, 5'-TCGGCCACCTAGAGATGATT-3' for *NUDT15* (150 bp); sense, 5'-GGTCTCCTCTGACTTCAA CA-3' and antisense, 5'-AGCCAAATTCGTTGTCATAC-3' for *GAPDH* (116 bp).

Western blotting and antibodies

Cell extracts and WBs were performed as previously described (26). Membranes were probed with anti-NUDT15 (HPA038968, SIGMA, 1/1000), anti- β -actin (A1978, Sigma, 1/5000) antibodies, at 4°C overnight. Signals were acquired using a CDD camera (G:BOX, Syngene).

Cell growth curves and soft agar colony formation assays

For growth curves, cells were seeded into 12-well plates at a density of 3×10^5 cells/well. Trypan blue staining was performed and viable cells were counted for 9 consecutive days.

The soft agar colony formation assay was performed as previously described (27).

Apoptosis by flow cytometry

Cells (5×10^5 cells/well) were grown in 6-well plates for 72 h. Apoptosis was measured using the Caspase-3, Active Form, mAb Apoptosis Kit, FITC (BD Biosciences). The signals were detected by a FACScalibur cytometer (BD Biosciences). The percentage of apoptotic cells was determined using the FlowJo software (Tree Star).

Mice experiments

Adult immunodeficient NOD-SCID mice were used for the *in vivo* experiments. Animals were handled in accordance to the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) statement for the use of animals in Ophthalmology and Research in Vision. Infected Y79 cells (shcontrol or shMED4) were used for orthotopic xenografts of the right eye. Under intraperitoneal general anesthesia with sodium pentobarbital, the pupil was dilated with 1 drop of tropicamide and then a drop of topical anesthetic proparacaine hydrochloride (0.5%) was applied. Injections were performed using a surgical microscope; 2 μ l of cell suspension (10 000 cells/ μ l) was injected into the subretinal space of the right eye of the three groups of mice using a Hamilton syringe with a 33-gauge needle. Special care was taken to prevent lens damage. After subretinal injection, ophthalmic examination of the mice was performed weekly after local anesthesia with a nasofibroscope. Clinical findings regarding the presence of a retinal tumor or the presence of a vitreous invasion were recorded. When tumor cells invaded the vitreous cavity, the mice were sacrificed by cervical dislocation for histological analyses. The eyes were immediately fixed in 4% formaldehyde, and then embedded in paraffin using conventional systems. The blocks were sectioned to obtain 5 μ m sections and stained with conventional hematoxylin-eosin; a second section was stained for KI67 (NovocastraTM Lyophilized Rabbit Polyclonal Antibody Ki67 Antigen, Leica Biosystems).

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary Material is available at HMG Online.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Gaëtan Amorim, Gaëlle Pierron, François Radvanyi and Marick Laé for their helpful support during the study.

Conflicts of Interest statements. None declared

FUNDING

This work was partially funded by Programme Incitativ et Coopératif 'Rétinoblastome' Institut Curie; and RETINOSTOP.

REFERENCES

- Knudson, A.G. Jr. (1971) Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **68**, 820–823.
- Comings, D.E. (1973) A general theory of carcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **70**, 3324–3328.
- Friend, S.H., Bernards, R., Rogelj, S., Weinberg, R.A., Rapaport, J.M., Albert, D.M. and Dryja, T.P. (1986) A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature*, **323**, 643–646.
- Toguchida, J., McGee, T.L., Paterson, J.C., Eagle, J.R., Tucker, S., Yandell, D.W. and Dryja, T.P. (1993) Complete genomic sequence of the human retinoblastoma susceptibility gene. *Genomics*, **17**, 535–543.
- Taylor, M., Dehainault, C., Desjardins, L., Doz, F., Levy, C., Sastre, X., Couturier, J., Stoppa-Lyonnet, D., Houdayer, C. and Gauthier-Villars, M. (2007) Genotype-phenotype correlations in hereditary familial retinoblastoma. *Hum. Mutat.*, **28**, 284–293.
- Bunin, G.R., Emanuel, B.S., Meadows, A.T., Buckley, J.D., Woods, W.G. and Hammond, G.D. (1989) Frequency of 13q abnormalities among 203 patients with retinoblastoma. *J. Natl. Cancer Inst.*, **81**, 370–374.
- Lehner, B. and Park, S. (2012) Cancer: Exploiting collateral damage. *Nature*, **488**, 284–285.
- Muller, F.L., Colla, S., Aquilanti, E., Manzo, V.E., Genovese, G., Lee, J., Eisenson, D., Narurkar, R., Deng, P., Nezi, L. *et al.* (2012) Passenger deletions generate therapeutic vulnerabilities in cancer. *Nature*, **488**, 337–342.
- Mitter, D., Ullmann, R., Muradyan, A., Klein-Hitpass, L., Kanber, D., Ounap, K., Kaulisch, M. and Lohmann, D. (2011) Genotype-phenotype correlations in patients with retinoblastoma and interstitial 13q deletions. *Eur. J. Hum. Genet.*, **19**, 947–958.
- Lohmann, D.R., Brandt, B., Hopping, W., Passarge, E. and Horsthemke, B. (1994) Distinct RB1 gene mutations with low penetrance in hereditary retinoblastoma. *Hum. Genet.*, **94**, 349–354.
- Harbour, J.W. (2001) Molecular basis of low-penetrance retinoblastoma. *Arch. Ophthalmol.*, **119**, 1699–1704.
- Castera, L., Sabbagh, A., Dehainault, C., Michaux, D., Mansuet-Lupo, A., Patillon, B., Lamar, E., Aerts, I., Lumbroso-Le Rouic, L., Couturier, J. *et al.* (2010) MDM2 as a modifier gene in retinoblastoma. *J. Natl. Cancer Inst.*, **102**, 1805–1808.
- Kanber, D., Berulava, T., Ammerpohl, O., Mitter, D., Richter, J., Siebert, R., Horsthemke, B., Lohmann, D. and Buiting, K. (2009) The human retinoblastoma gene is imprinted. *PLoS Genet.*, **5**, e1000790.
- Napoli, C., Sessa, M., Infante, T. and Casamassimi, A. (2012) Unraveling framework of the ancestral Mediator complex in human diseases. *Biochimie*, **94**, 579–587.
- Malik, S. and Roeder, R.G. (2010) The metazoan Mediator co-activator complex as an integrative hub for transcriptional regulation. *Nat. Rev. Genet.*, **11**, 761–772.
- Spaeth, J.M., Kim, N.H. and Boyer, T.G. (2011) Mediator and human disease. *Semin. Cell. Dev. Biol.*, **22**, 776–787.
- Zhang, L., Cui, J., Leonard, M., Nephew, K., Li, Y. and Zhang, X. (2013) Silencing MED1 sensitizes breast cancer cells to pure anti-estrogen fulvestrant *in vitro* and *in vivo*. *PLoS One*, **8**, e70641.
- Angus, S.P. and Nevins, J.R. (2012) A role for Mediator complex subunit MED13L in Rb/E2F-induced growth arrest. *Oncogene*, **31**, 4709–4717.
- Lando, M., Holden, M., Bergersen, L.C., Svendsrud, D.H., Stokke, T., Sundfor, K., Glad, I.K., Kristensen, G.B. and Lyng, H. (2009) Gene dosage, expression, and ontology analysis identifies driver genes in the carcinogenesis and chemoradioresistance of cervical cancer. *PLoS Genet.*, **5**, e1000719.
- Wagner, N., Wagner, K.D., Schley, G., Badiali, L., Theres, H. and Scholz, H. (2003) 1,25-dihydroxyvitamin D3-induced apoptosis of retinoblastoma cells is associated with reciprocal changes of Bcl-2 and bax. *Exp. Eye Res.*, **77**, 1–9.
- Rhodes, D.R., Kalyana-Sundaram, S., Mahavisno, V., Varambally, R., Yu, J., Briggs, B.B., Barrette, T.R., Anstet, M.J., Kincaid-Beal, C., Kulkarni, P. *et al.* (2007) Oncomine 3.0: genes, pathways, and networks in a collection of 18,000 cancer gene expression profiles. *Neoplasia*, **9**, 166–180.
- Nijhawan, D., Zack, T.I., Ren, Y., Strickland, M.R., Lamothe, R., Schumacher, S.E., Tsherniak, A., Besche, H.C., Rosenbluh, J., Shehata, S. *et al.* (2012) Cancer vulnerabilities unveiled by genomic loss. *Cell*, **150**, 842–854.

23. Bignell, G.R., Greenman, C.D., Davies, H., Butler, A.P., Edkins, S., Andrews, J.M., Buck, G., Chen, L., Beare, D., Latimer, C. *et al.* (2010) Signatures of mutation and selection in the cancer genome. *Nature*, **463**, 893–898.
24. Castera, L., Dehainault, C., Michaux, D., Lumbroso-Le Rouic, L., Aerts, I., Doz, F., Pelet, A., Couturier, J., Stoppa-Lyonnet, D., Gauthier-Villars, M. *et al.* (2013) Fine mapping of whole RB1 gene deletions in retinoblastoma patients confirms PCDH8 as a candidate gene for psychomotor delay. *Eur. J. Hum. Genet.*, **21**, 460–464.
25. Dehainault, C., Lauge, A., Caux-Moncoutier, V., Pages-Berhouet, S., Doz, F., Desjardins, L., Couturier, J., Gauthier-Villars, M., Stoppa-Lyonnet, D. and Houdayer, C. (2004) Multiplex PCR/liquid chromatography assay for detection of gene rearrangements: application to RB1 gene. *Nucleic Acids Res.*, **32**, e139.
26. Rocques, N., Abou Zeid, N., Sii-Felice, K., Lecoin, L., Felder-Schmittbuhl, M.P., Eychene, A. and Pouponnot, C. (2007) GSK-3-mediated phosphorylation enhances Maf-transforming activity. *Mol. Cell.*, **28**, 584–597.
27. Pouponnot, C., Sii-Felice, K., Hmitou, I., Rocques, N., Lecoin, L., Druillennec, S., Felder-Schmittbuhl, M.P. and Eychene, A. (2006) Cell context reveals a dual role for Maf in oncogenesis. *Oncogene*, **25**, 1299–1310.