



HAL
open science

Développement de thérapeutiques combinées ciblant des altérations épigénétiques de la voie des récepteurs à dépendance

Mélodie Grandin

► **To cite this version:**

Mélodie Grandin. Développement de thérapeutiques combinées ciblant des altérations épigénétiques de la voie des récepteurs à dépendance. Cancer. Université Claude Bernard - Lyon I, 2015. Français. NNT : 2015LYO10274 . tel-01407348

HAL Id: tel-01407348

<https://theses.hal.science/tel-01407348>

Submitted on 5 Jan 2017

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.

THÈSE DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

Délivrée par
L'UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD LYON 1

ÉCOLE DOCTORALE Biologie Moléculaire Intégrative et Cellulaire

DIPLOME DE DOCTORAT

soutenue publiquement le 1^{er} décembre 2015

par

Mélodie Grandin

Développement de thérapeutiques combinées ciblant des altérations épigénétiques de la voie des récepteurs à dépendance

Directeur de thèse: Robert Dante
Directeur de l'équipe : Patrick Mehlen

Directeur du CRCL: Alain Puisieux

JURY:

| | |
|--------------------------|--------------------|
| M. Alain PUISIEUX | Président |
| Monsieur Giacomo Cavalli | Rapporteur |
| Monsieur Philippe Juin | Rapporteur |
| Monsieur Hugues de thé | Examineur |
| Monsieur Alain Puisieux, | Examineur |
| Monsieur Patrick MEHLEN | Examineur |
| Monsieur Robert DANTE | Directeur de thèse |

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

M. François-Noël GILLY

Vice-président du Conseil d'Administration

M. le Professeur Hamda BEN HADID

Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire

M. le Professeur Philippe LALLE

Vice-président du Conseil Scientifique

M. le Professeur Germain GILLET

Directeur Général des Services

M. Alain HELLEU

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Faculté d'Odontologie

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : Mme. la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Directeur : M. F. DE MARCHI

Département Biologie

Directeur : M. le Professeur F. FLEURY

Département Chimie Biochimie

Directeur : Mme Caroline FELIX

Département GEP

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Département Informatique

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Département Mathématiques

Directeur : M. le Professeur Georges TOMANOV

Département Mécanique

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Département Physique

Directeur : M. Jean-Claude PLENET

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Directeur : M. Y. VANPOULLE

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Polytech Lyon

Directeur : M. P. FOURNIER

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Directeur : M. G. PIGNAULT

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Directeur : M. le Professeur C. VITON

Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education

Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. N. LEBOISNE

RESUME – ABSTRACT

Développement de thérapies combinées ciblant des altérations épigénétiques de la voie des récepteurs à dépendance: Dans certains cancers, le ligand nétrine-1 (NTN1) est surexprimé, induisant alors une inhibition de l'apoptose induite par ses récepteurs à dépendance DCC et UNC5H, et promouvant ainsi la progression tumorale. Néanmoins, dans d'autres cancers, l'inhibition sélective de l'apoptose induite par cette voie de signalisation est liée à la perte d'expression de protéines pro-apoptotiques effectrices. Dans cette étude, nous avons montré chez l'homme qu'une forte proportion de cancers mammaires et pulmonaires subit des pertes d'expression de *DAPK1* et *NTN1* liées à l'hyperméthylation de leur promoteur. *DAPK1* est une protéine kinase notamment responsable de la transmission du signal pro-apoptotique des récepteurs à dépendance en absence de leur ligand nétrine-1. L'inhibition de la méthylation de l'ADN à l'aide d'épidrogues telles que la décitabine dans les cancers exprimant faiblement *NTN1* restaure l'expression à la fois de *DAPK1* et *NTN1*. Ainsi, la combinaison de traitements décitabine avec des stratégies induisant le silence transcriptionnel de NTN1, ou des anticorps bloquant l'interaction entre le ligand (NTN1) et son récepteur (UNC5B dans le cas présent), induit la potentialisation de la mort cellulaire des tumeurs, et bloque efficacement la croissance tumorale dans différents modèles animaux. Ainsi, combiner l'utilisation d'inhibiteurs de la méthylation de l'ADN avec des agents neutralisant la nétrine-1 pourrait représenter une stratégie pertinente pour combattre ces cancers.

Mots clés : cancer, épigénétique, récepteurs à dépendance, nétrine-1, méthylation de l'ADN, décitabine, thérapies, apoptose.

Development of combined therapy targeting epigenetic disruption of dependence receptors apoptosis pathway: In a substantial part of human cancers, netrin-1 (*NTN1*) is up-regulated and this up-regulation is inhibiting apoptosis induced by its so-called dependence receptors DCC and UNC5H and thus promotes tumor progression. However, in other cancers, the selective inhibition of this dependence receptor death pathway relies on the silencing of pro-apoptotic effector proteins. We show here that a large fraction of human breast and lung tumors exhibits simultaneous DNA methylation-dependent loss of expression of *NTN1* and of *DAPK1*, a serine threonine kinase known to transduce the netrin-1 dependence receptor pro-apoptotic pathway. The inhibition of DNA methylation by drugs such as decitabine in netrin-1-low cancer cells restores the expression of both *NTN1* and *DAPK1*. Consequently, the combination of decitabine with *NTN1* silencing strategies or with an anti-netrin-1 neutralizing antibody potentiates tumor cell death and efficiently blocks tumor growth in different animal models. Thus, combining DNA methylation inhibitors with netrin-1 neutralizing agents may be a valuable strategy for combating cancer.

Keywords: cancer, epigenetics, dependence receptors, netrin-1, DNA methylation, decitabine, therapy, apoptosis.

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres prestigieux de mon jury Alain Puisieux, Hugues de Thé, Philippe Juin et Giacomo Cavalli de me faire l'honneur d'évaluer ces travaux de thèse. Je remercie plus particulièrement les docteurs Philippe Juin et Giacomo Cavalli d'avoir accepté de prendre le temps de lire et d'évaluer mon manuscrit.

Je tiens également à remercier chaleureusement **Robert Dante**, qui m'a accueilli dans son groupe, m'a appris, m'a fait confiance; il est probablement la personne avec laquelle j'ai passé le plus de temps ces 5 dernières années et je peux le dire sans hésiter : c'est sans regret. Vous avez été pour moi un véritable papa de la science, mais également un chef et un ami. Merci de m'avoir transmis cette passion qui vous anime pour l'épigénétique et la biologie en général. **Serge Lebecque** m'a dit que la science qui passionne avait un gout de café ; vous en êtes un merveilleux exemple (avec la cigarette en plus).

Un immense merci également à **Patrick Mehlen**, qui m'a accueilli chaleureusement au sein de son équipe, et m'a fait confiance durant ces cinq dernières années. Je ne serais pas présente ici sans son soutien et ce depuis le tout début. L'énergie et le dynamisme de cette figure emblématique de la recherche française nous a permis d'aboutir un certain nombre de nos travaux, dans la sueur et dans la joie.

Je tiens également à remercier les personnes avec lesquelles j'ai eu la chance de travailler dans le cadre de collaborations, en particulier **Akram Ghantous**, **Nicolas Gadot**, **Julie Valantin** et **Armelle**, **Yannick Bidet** et **Sandrine Viala**.

Merci à toutes les personnes avec lesquelles j'ai eu l'honneur de travailler durant ces dernières années, particulièrement **Guillaume Devailly**, qui fut pour moi un collègue rempli d'éloquence. Je te souhaite énormément de jolies choses cher docteur ! Je tiens également à remercier l'ensemble des personnes de l'équipe avec lesquelles j'ai eu la chance d'échanger durant ces années, notamment mes charmantes et brillantes collègues **Pauline**, **Ana** et **Duygu**.

Je souhaiterais également remercier sincèrement l'ensemble de mes proches, qui ont su m'écouter durant ces incontournables monologues de thésards racontant les affres de cette aventure. Tout d'abord ma famille, qui a toujours été présente pour moi. Le test est réussi, même une décennie loin de vous ne suffit pas à dissoudre ne serait-ce qu'un peu de l'amour que je vous porte.

Un grand Merci à mon papa et ma maman, pour tout le soutien qu'ils m'ont apporté durant ces années, leur confiance absolue en mes capacités. Sans votre aide, je n'aurai jamais pu continuer mes études, merci d'avoir toujours cru en moi, de vous être montrés si compréhensifs, et de m'aimer si fort.

Merci à ma sœur et mon beau-frère, qui représentent tant mes yeux. Vous êtes mes amis, mes alliés et mes confidents, les meilleurs qu'il puisse exister. Un grand merci également à mon frère et ma belle-soeur, protecteurs et bienveillants, pour tous les moments de partage que l'on a eu l'occasion d'échanger ces dernières années. Enfin, de très jolies pensées à mes neveux et nièces, que je n'ai pas vu grandir...

Un merci rempli de jolies pensées pour mon compagnon, qui m'a toujours soutenu même lorsque je ne le voyais que trop peu, dans la fatigue et le stress, dans les larmes et dans la joie. C'est à tes côtés que se trouve ma place.

Un grand merci à mes amis, notamment **Clément**, **Azza**, **Gab** et **Adeline**, **Pierre**, **Missa**, **Le Yan**, **Yann** le tailleur de cathédrales, **David**, **Will** et **Nath** et j'en oublie... Vous faites partie des gens que j'aime, merci pour tous ces moments de partage merveilleux, je sais qu'il y en aura beaucoup d'autres. Je ne peux remercier mes amis sans évoquer **Florent** (dit Isaïa le barbu) et **Ophélie**, qui en plus d'être des membres de ma famille mais sont également mes meilleurs et plus précieux amis.

Ces dernières années ont été pour moi sous le signe de grands changements, sauf pour la présence des inconditionnels, ces gens que j'aime, que je porte et qui me portent. Léo Ferré n'a pas dit toute la vérité, avec le temps tout ne s'en va pas, le meilleur reste aussi parfois.

Sommaire

| | |
|---|------------|
| Sommaire | 6 |
| Liste des figures et tableaux..... | 9 |
| Liste des abréviations..... | 12 |
| 1 INTRODUCTION | 15 |
| 1.1 Cancérologie..... | 15 |
| 1.1.1 Introduction | 15 |
| 1.1.2 Grands principes de cancérologie | 16 |
| 1.1.3 Mutations, instabilité chromosomique | 20 |
| 1.1.4 Modélisation « drivers » et « passagers »..... | 27 |
| 1.1.5 Cancer et thérapeutique : exemples du sein et du poumon..... | 28 |
| 1.1.6 L'explosion des technologies haut-débit, un petit pas pour l'homme, un grand pas pour la recherche en cancérologie..... | 41 |
| 1.2 . Epigénétique, régulation des transcriptomes et dérégulations dans les cancers | 42 |
| 1.2.1 Introduction | 42 |
| 1.2.2 Organisation de la chromatine et régulation transcriptionnelle | 42 |
| 1.2.3 Les ARN non codants | 48 |
| 1.2.4 La méthylation de l'ADN..... | 49 |
| 1.2.5 Altérations épigénétiques dans les cancers | 63 |
| 1.3 La voie négative du récepteur à dépendance UNC5B, une voie d'apoptose altérée dans les cancers. | 74 |
| 1.3.1 Apoptose et cancers..... | 74 |
| 1.3.2 Les récepteurs à dépendance, une famille fonctionnelle impliquée dans la mort cellulaire. 87 | |
| 1.3.3 La nétrine-1 et ses récepteurs..... | 92 |
| 1.3.4 Voie Nétrine-1/ UNC5B, régulation et dérégulations dans les cancers..... | 103 |
| 1.3.5 Conclusion: le ciblage de la nétrine-1 dans les cancers, une stratégie thérapeutique suffisante?..... | 106 |
| 2 RESULTATS..... | 109 |

| | | |
|--------|--|-----|
| 2.1 | Papier N°1 : Décodage structurel de l'interaction nétrine-1/ UNC5B et implications thérapeutiques dans les cancers | 110 |
| | Summary..... | 113 |
| | Significance | 113 |
| | Results | 116 |
| | Netrin-1 interacts with UNC5H2 via its laminin V-2 sub-domain..... | 116 |
| | Identification of an anti-netrin-1 antibody blocking netrin-1/UNC5H2 interaction | 118 |
| | The NET1-H-mAb efficiently inhibits netrin-1 expressing tumor growth | 119 |
| | Non-GMP Safety analysis of the NET1-H-mAb..... | 122 |
| | Discussion..... | 123 |
| | Methods | 124 |
| | Acknowledgements | 130 |
| | Author contribution | 130 |
| | Author information..... | 130 |
| | References | 131 |
| | Figures and legends | 135 |
| | Supplemental information | 143 |
| | Supplemental References | 157 |
| 2.2 | Papier n°2 : L'inhibition de la méthylation de l'ADN favorise la sensibilité des tumeurs mammaires à l'interférence à la nétrine-1 | 158 |
| 2.2.1 | Préambule..... | 159 |
| 2.2.2 | Abstract | 160 |
| 2.2.3 | Introduction | 160 |
| 2.2.4 | Results | 162 |
| 2.2.5 | Discussion | 169 |
| 2.2.6 | Acknowledgements | 171 |
| 2.2.7 | Materials and methods | 172 |
| 2.2.8 | Figures and legends..... | 179 |
| 2.2.9 | Supplemental data | 185 |
| 2.2.10 | Bibliography..... | 196 |
| 2.3 | Travaux complémentaires non publiés..... | 200 |
| 2.3.1 | Des données supplémentaires pour les cohortes TCGA | 200 |
| 2.3.2 | Les autres partenaires de la voie apoptotique d'UNC5B, étude <i>in vitro</i> | 209 |

| | | |
|----------|--|------------|
| 3 | DISCUSSION | 210 |
| 3.1 | Introduction et résumé des travaux | 210 |
| 3.2 | La voie pro-apoptotique des récepteurs à dépendance, mécanismes et altérations dans les cancers 214 | |
| 3.2.1 | La mort cellulaire induite par les récepteurs à dépendance : questions générales inhérentes au concept. | 214 |
| 3.2.2 | Les différents acteurs de la voie pro-apoptotique d'UNC5B, expression et altérations dans les tumeurs | 220 |
| 3.3 | Altérations épigénétiques de cette voie dans les cancers..... | 228 |
| 3.3.1 | La méthylation de l'ADN..... | 229 |
| 3.3.2 | Rôle potentiel des MBP..... | 238 |
| 3.3.3 | Rôle potentiel des modifications d'histones..... | 238 |
| 4 | CONCLUSIONS | 245 |
| 5 | ANNEXES | 246 |
| 5.1 | Participation à d'autres travaux : Dynamique de la fixation de MBD2 sur les régions méthylées de l'ADN lors de la transformation maligne de cellules épithéliales mammaires humaines..... | 246 |
| 5.1.1 | Préambule..... | 246 |
| 5.1.2 | Publication..... | 247 |
| 6 | BIBLIOGRAPHIE..... | 290 |

Liste des figures et tableaux

| | |
|---|-----|
| Figure 1 : Les caractéristiques acquises par les cellules transformées indispensables au développement du cancer..... | p16 |
| Figure 2 : Les systèmes de réparation de l'ADN. | p23 |
| Figure 3 : Processus cellulaires impliqués dans la réplication et la ségrégation des chromosomes pendant la mitose | p25 |
| Figure 4 : Incidence des cancers mammaires dans le monde | p27 |
| Figure 5 : Mortalité des cancers mammaires dans le monde. | p28 |
| Figure 6 : Coupe schématique du sein, de profil. | p29 |
| Figure 7 : Schéma représentatif du développement de carcinome mammaire. | p30 |
| Figure 8 : Incidence et mortalité liées au cancer du poumon. | p34 |
| Figure 9 : Structure d'un poumon. | p35 |
| Figure 10 : Etats de compaction de la chromatine. | p44 |
| Figure 11 : Mécanismes de méthylation <i>de novo</i> et de maintenance par les DNMTs..... | p50 |
| Figure 12 : phénotypes des souris <i>Dnmt -/-</i> | p51 |
| Figure 13 : Principe de la déméthylation passive..... | p52 |
| Figure 14 : Structure des protéines MBP | p57 |
| Figure 15 : Organisation des nucléosomes et modifications de la chromatine liées à la méthylation de l'ADN..... | p60 |
| Figure 16 : Jeu croisé entre les marques épigénétiques, et conséquences sur la répression transcriptionnelle dans les cellules normales..... | p61 |
| Figure 17 : Description des altérations épigénétiques observables durant l'oncogénèse..... | p63 |
| Figure 18 : Altérations des profils de méthylation au cours de la cancérogenèse..... | p63 |
| Figure 19 : Sélection de gènes intervenant dans la régulation épigénétique qui sont fréquemment altérés dans les cancers. | p64 |
| Figure 20 : Drogues épigénétiques développées pour la thérapie anticancer..... | p66 |
| Figure 21 : Mécanismes d'activation des pro-médicaments décitabine et azacytidine..... | p70 |

| | |
|---|------|
| Figure 22 : Structure et activation des caspases | p76 |
| Figure 23 : Représentation des voies d'activation de l'apoptose dépendante des caspases | p79 |
| Figure 24 : L'apoptose, un rôle majeur dans la cancérogénèse..... | p82 |
| Figure 25 : Cibler l'apoptose en thérapie anti-cancéreuse..... | p85 |
| Figure 26 : Contrôle du relargage du cytochrome c..... | p86 |
| Figure 27 : Concept des récepteurs à dépendance..... | p87 |
| Figure 28 : Membres de la famille fonctionnelle des récepteurs à dépendance..... | p89 |
| Figure 29 : Structure des nétrines | p92 |
| Figure 30 : La voie pro-apoptotique d'UNC5B | p98 |
| Figure 31 : Régulation p53 dépendante de la voie d'UNC5B en présence de nétrine-1 | p100 |
| Figure 32 : Altérations de la voie des récepteurs à dépendance dans les cancers | p101 |
| Figure 33 : Problématique de mes travaux de thèse | p107 |
| Figure 34 : Perte de <i>DAPK1</i> dans les adénocarcinomes pulmonaires et stades tumoraux..... | p196 |
| Figure 35 : Corrélation méthylation et expression dans les NSCLC..... | p197 |
| Figure 36 : Mutations, délétions et amplifications des principaux gènes de la voie pro-apoptotique d'UNC5B dans les NSCLC | p198 |
| Figure 37 : Courbes de survie en fonction de l'expression de <i>DAPK1</i> et <i>NTN1</i> dans les carcinomes mammaires | p200 |
| Figure 38 : Expression des gènes de la voie pro-apoptotique d'UNC5B dans les tumeurs mammaires triple négatives. | p201 |
| Figure 39 : Altérations génétiques des gènes de la voie pro-apoptotique d'UNC5B dans les tumeurs mammaires. | p201 |
| Figure 40 : Altérations du nombre de copies de <i>NTN1</i> dans les tumeurs mammaires | p202 |
| Figure 41 : Altérations de l'expression des gènes de la voie pro-apoptotique d'UNC5B dans les tumeurs mammaires | p203 |
| Figure 42 : Altérations de l'expression des gènes <i>NEO1</i> et <i>RGMA</i> dans les tumeurs mammaires, et relations avec la voie pro-apoptotique d'UNC5B | p204 |
| Figure 43 : Expression des partenaires de la voie pro-apoptotique d'UNC5B | p205 |
| Figure 44 : Régulation croisée entre les voies d'UNC5B et Néogénine | p223 |

Figure 45 : Schéma simplifié de la mise en place de répression transcriptionnelle, et des différentes drogues pouvant affecter ce système p225

Figure 46 : Approche d'évaluation et profils de la méthylation de l'ADN au niveau des promoteurs *NTN1*, *UNC5B* et *DAPK1* dans les lignées H460, MDA-MB-231 et HMLER p227

Figure 47 : Profils de perte de méthylation à l'échelle du génome, testé par pyroséquençage des éléments répétés LINE-1 dans les modèles cellulaires MDA-MB-231, HMLER et H460 p228

Figure 48 : Principe du bisulfite et de la digestion HpaII/ MspI p230

Figure 49 : Le traitement décitabine induit une déméthylation de l'ADN. p231

Figure 50 : Détermination du taux global de méthylation des séquences LINE-1 p232

Figure 51 : Expression relative des gènes *MBD2*, *UNC5C*, *UNC5B*, *NTN1* et *DAPK1* dans les cellules HMLER traitées avec siRNA dirigé contre *MBD2* p234

Figure 52 : Représentation schématique du développement des anticorps (Ac) monoclonaux thérapeutiques p244

Tableaux

Tableau 1 : Lésions de l'ADN d'origines endogènes et exogènes. p21

Tableau 2 : Tableau résumant les sous types de cancers du sein et leurs signatures moléculaires associées p32

Tableau 3 : Critères de classification TNM des cancers du poumon p37

Tableau 4 : Détermination du stade de la maladie par l'intermédiaire des grades TNM p37

Tableau 5 : Principales modifications épigénétiques des queues d'histones et de l'ADN et fonctions biologiques associées p46

Tableau 6 : Protéines à domaine MBD, liaison à l'ADN méthylé et fonctions associées p58

Tableau 7 : Liste de gènes hyperméthylés dans les cancers du sein et du poumon. p65

Tableau 8 : Classification et caractéristiques des différents types de mort cellulaire programmée. p74

Tableau 9 : Les récepteurs à dépendance et leur(s) ligand(s) p90

Tableau 10 : Phénotypes des mutants de la voie des récepteurs à dépendance spécifiques de la nétrine, et le partenaire pro-apoptotique d'*UNC5B* : *DAPK1* p93

Liste des abréviations

5caC: 5-carboxycytosine
5fC: 5-formylecytosine
5hmC: 5- hydroxyméthylecytosine
ADD : Addiction Dependence Domain
ADK : Adénocarcinome
ADN : Acide desoxyribonucléique
AIF : Apoptosis Inducing Factor
ALK : Anaplastic Lymphoma Kinase
AMM : autorisation de mise sur le marché
AMPc : Adenosine Mono Phosphate cyclique
AOM: AzOxyMethane
APAF1 : Apoptotic protease-activating factor 1
APC : Adenomatosis polyposis coli
ARNi : interférence à l'ARN
ARNm : acide ribonucléique messenger
ATP : Adenosine-triphosphate
BAD : BCL2-associated agonist of cell death
BAK : BCL2-antagonist/killer
BAX : BCL2-associated X protein
Bcl-2 : B-cell CLL/lymphoma 2
BER : Base excision Repair
BH3 : Bcl-2 homology domain 3
BID : BH3-Interacting Domain death agonist
BIM : BCL2-Interacting Mediator of cell death
BRCA1 : Breast cancer 1
BTB/POZ : Broad Complex, Tramtrak, Bric à brac/ Pox virus and zing finger
CAD: Caspase Activated Dnase
CARD : CAspase ReCRuitement Domain
Caspase : Cystein ASPartyl proteASE
CDB : cassure double brin
CDO : Cell-adhesion-molecule-related
c-FLIP : cellular FLICE/Caspase 8 Inhibitor Protein
cIAP : Cellular Inhibitor of Apoptosis
CIMP : phénotype méthylateur des ilots CpG
CIP2A : Cancerous Inhibitor of PP2A
CpG : cytosine et guanine adjacentes reliées par un phosphate
CSB : cassure simple brin
DAPK : Death Associated Protein Kinase
DCC : Deleted in Colorectal Carcinoma
DD : Death Domain
DDR : DNA damage response
DED : Death Effector Domain
DIP13 α : DCC Interacting Protein 13 α
DISC : death-inducing signalling complex
DNA Deoxyribonucleic acid
DNMT : DNA methyltransferase, méthyltransférases d'ADN
dNTP : deoxyribonucleoside 5'-triphosphate

DR : Dependence receptor
 DR3 et 6 : Death Receptor 3 et 6
 EGF : Epidermal Growth Factor
 EGFR : EGF receptor
 EMT : Epithelial-mesenchymal transition
 FADD : Fas-Associated protein with a Death Domain FL : Follicular Lymphoma
 FAK : Focal Adhesion Kinase
 FASL : FAS ligand
 GDNF : Glial cell Derived Neurotrophic Factor
 GST : gène suppresseur de tumeur
 GTP : Guanosine triphosphate
 H3/H4 : histone 3/ histone 4
 H3K9 : lysine 9 de l'histone 3
 HAT : histone acetyltransferase, acétyltransférase d'histones
 HDAC : histone deacetylase, désacétylases d'histones
 HDAC Histone deacetylase
 HL : lymphomes hodgkiniens
 HMT : histone methyltransferase, méthyltransférases des histones
 hTERT : human telomerase reverse transcriptase, transcriptase inverse de la télomérase humaine
 IAP: Inhibitor of Apoptosis Protein
 ICAD : Inhibitor of CAD
 ICD : Intracellular domain
 IGF-1 : Insulin-like Growth Factor 1
 IGF1R : Insulinlike Growth Factor Receptor I IR : Insulin Receptor
 kb : kilobases
 kDa : kiloDaltons
 KF : Killer fragment
 KO : Knock out
 lnc-RNA : ARN longs non codants
 LOH : Loss Of Heterozygoty
 MAPK : Mitogen-Activated-Protein-Kinase
 MBD: methyl-CpG Binding Domain
 MBP: Methyl-DNA-Binding Proteins
 MCP : Mort Cellulaire Programmée
 MET: MNNG HOS Transforming gene
 MGMT : O-6-methylguanine-DNA methyltransferase
 MOMP Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization
 MSP : Methylation specific PCR
 NALP1: NLR family, pyrin domain containing 1
 N-CAM: Neural-Cell Adhesion Molecule
 NER : nucleotide excision repair
 NFkB: Nuclear transcription Factor κB
 NGF: Nerve Growth Factor
 NGFR: Nerve Growth Factor Receptor
 NHEJ : non homologous end joining
 NLS : Nuclear localization signal
 NRAGE: Neurotrophin Receptor-interacting MAGE
 NSCLC : Non Small cell lung cancer
 PARP : Poly ADP-Ribose Polymerase
 pb : Paires de bases
 PCR : Polymerase Chain Reaction, réaction de polymérisation en chaîne

PI3K : Phosphatidylinositol 3-kinase
PIDD : P53-induced death domain protein
PKC : Protein kinase C
PP2A: Protein Phosphatase
Q-RT-PCR Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction
RCD : mort cellulaire régulée
RCM: Rostral Cerebellar Malformation
RET: Rearranged during Transfection
RGM: Repulsive Guidance Molecule
RGMa : Repulsive Guidance Molecule a RhoA : Ras homologous member-A SAM : Sterile Alpha Motif
RhoA : Ras homologous member-A
RNA : Ribonucleic acid
RTK : Recepteur tyrosine kinase
SAH : S-adenosyl-L-homocystéine
SAM : S-adénosyl-méthionine
SHH: Sonic Hedgehog
SRA : SET and RING finger associated
tBID Truncated BID
TCR : T cell antigen receptor TLR : Toll Like Receptor
TET: Ten Eleven Translocation methylcytosine dioxygenase
TGF: Transforming Growth Factor
TNF: Tumor Necrosis Factor
TNF-R : Tumor Necrosis Factor Receptor
TRAIL : TNF-related apoptosis inducing ligand
TRAILR : TRAIL receptor
TRD : transcriptional repression domain, domaine protéique de répression transcriptionnelle
TSA : Trichostatine A
TUNEL : Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end
U.V : ultra-violet
UHRF: Ubiquitin-like with PHD and ring finger domains
UNC5: Uncoordinated-5 homologous
VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR: Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
ZU-5: Zona-occludens/Unc-5 homology domain

1 INTRODUCTION

1.1 Cancérologie

1.1.1 Introduction

A l'heure actuelle, le cancer est la cause de décès d'une personne sur 8 dans le monde, et son incidence augmente à l'échelle globale. Si les taux ne changent pas, on estime d'ici 2030 observer 21,7 millions de nouveaux cas ainsi que 13 millions de décès [1]. On estime qu'environ 39,6% des êtres humains seront diagnostiqués pour un cancer au cours de leur vie [2]. Dans le monde, le cancer englobe plus de 100 maladies distinctes avec divers facteurs de risque, et peut provenir de la plupart des types cellulaires et organes du corps humain. Les cellules tumorales sont caractérisées par une prolifération peu restreinte, ainsi qu'une capacité d'invasion des tissus normaux adjacents et de métastase dans des organes plus éloignés.

On suppose que chaque cancer possède une pathogénie commune ; chaque tumeur serait le résultat d'un processus d'évolution darwinienne se produisant au sein des populations cellulaires et de leur micro-environnement tissulaire. De manière analogue à l'évolution darwinienne survenant dans l'origine des espèces, le développement du cancer est basé sur deux principaux processus : l'acquisition continue de variations génétiques héréditaires dans des cellules individuelles par la survenue plus ou moins aléatoire de mutations, et la sélection naturelle agissant sur la diversité phénotypique résultante. La sélection permet alors d'éliminer des cellules qui ont acquis des mutations délétères à leur survie, ou de favoriser les cellules portant des modifications améliorant leurs capacités de prolifération, de survie etc...

Dans chaque être humain adulte, il y a probablement des milliers de petits vainqueurs de cette compétition permanente, dont la plupart ont une capacité de croissance aberrante limitée et sont invisibles, ou alors manifestent des tumeurs bénignes courantes telles que les grains de beauté.

Cependant, une simple cellule peut parfois acquérir un ensemble de mutations suffisamment avantageuses pour lui permettre de proliférer de manière autonome, d'envahir les tissus et de métastaser [3].

En suivant cette démarche, nous pouvons donc nous demander quelles sont les voies physiologiques essentiellement altérées dans les cancers, et ainsi tenter de visualiser quels sont les principales « nécessités » en terme de survie d'une cellule tumorale.

1.1.2 Grands principes de cancérologie

1.1.2.1 L'hypothèse « two hits » de Knudson

A partir de précédentes études, Knudson a émis en 1971 l'hypothèse selon laquelle le développement tumoral (en particulier pédiatrique) résulterait de deux évènements majeurs de mutations, dont le premier pouvait être une prédisposition génétique familiale, mais que d'autres mutations supplémentaires (4 ou plus, comme par exemple PI3K, p53...) seraient nécessaires pour les cancers chez l'adulte. En effet, le caractère « malin » d'une cellule résulterait d'un processus itératif de mutations somatiques suivi d'une expansion clonale [4]. Cette hypothèse s'applique essentiellement aux gènes suppresseurs de tumeurs (GST), les deux coups représentant alors le nombre d'évènements nécessaires à son inactivation. En effet, il n'est pas rare d'observer une haplo-insuffisance lors de l'altération d'un allèle de gène suppresseur de tumeur, la mutation étant régulièrement récessive. Dans ce contexte, l'haplo-insuffisance d'un GST peut également favoriser la formation tumorale si la cellule est également altérée pour d'autres voies, et/ou que le microenvironnement est altéré.

1.1.2.2 Les grandes voies altérées dans les cancers

Le vaste catalogue de géotypes des cellules tumorales est composé d'une dizaine de grandes voies altérées, qui dictent collectivement la croissance maligne (**Figure 1**)

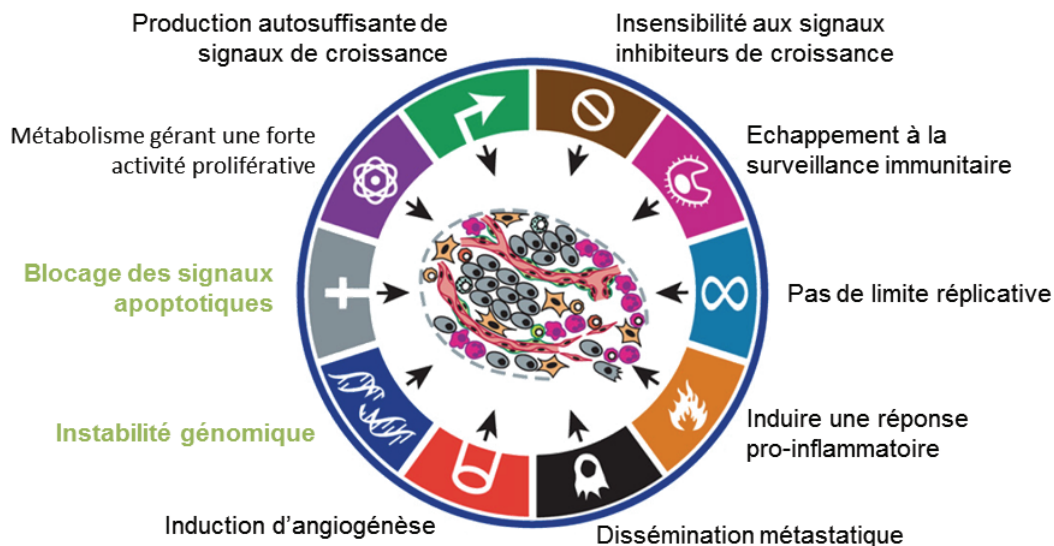


Figure 1: Les caractéristiques acquises par les cellules transformées indispensables au développement du cancer. Les cellules tumorales accumulent des altérations au cours de la transformation. Le développement de la pathologie est ainsi associé à l'acquisition de nouvelles propriétés des cellules tumorales: une autosuffisance en production de facteurs de croissance, un métabolisme leur permettant de supporter une forte activité mitotique, une absence de limite répliative, la sécrétion de facteurs favorisant l'angiogénèse et la capacité de quitter le site d'initiation de la tumeur conduisant à la formation de métastases à distance.

L'évolution du cancer est aussi liée à une perte des fonctions cellulaires conduisant à: une insensibilité aux signaux inhibiteurs de croissance, une instabilité génétique et l'altération des programmes apoptotiques. L'induction d'une réponse inflammatoire peut être associée à une augmentation de l'agressivité de la lésion ainsi qu'à une plus forte angiogénèse et la plasticité des cellules tumorales sous la pression du système immunitaire conduit également à l'émergence de clones tumoraux échappant à la destruction par les cellules immunes. L'ensemble de ces caractéristiques distingue les cellules tumorales des cellules saines et participe à l'agressivité et à l'évolution de la pathologie.

- **Le maintien d'une signalisation proliférative**

Les cellules normales voient leur croissance mitotique dépendante de signaux extrinsèques, qui lui sont transmis par diffusion (facteurs de croissance), via leurs récepteurs, ou plus simplement par l'intermédiaire de molécules d'adhésion/ d'interaction liées au contact entre deux cellules ou

entre une cellule et la matrice extracellulaire. De nombreux oncogènes miment ces signalisations ; ainsi la cellule tumorale produit elle-même ces signaux prolifératifs, et réduit d'elle-même sa dépendance envers les signaux mitotiques exogènes (provenant du microenvironnement). Trois principales stratégies sont utilisées par les cellules tumorales pour asseoir leur autonomie ; elles impliquent des altérations des signaux de croissance extracellulaires, des transducteurs intercellulaires de ces signaux, ainsi que des circuits intracellulaires responsables de la traduction de ces signaux en action. Ces quinze dernières années, un grand nombre de publications ont également permis de souligner l'importance du microenvironnement tumoral dans l'émergence de néoplasies ; par exemple, il a été montré que les cellules tumorales sont capables de stimuler des cellules normales adjacentes via un stroma anormal, ce qui leur permet de recevoir en retour différents facteurs de croissance [5, 6].

- **L'insensibilité aux signaux inhibiteurs de la croissance**

Les cellules cancéreuses, en plus de leur capacité à induire et maintenir des signaux positifs de croissance, peuvent réguler négativement les voies de signalisation susceptibles d'inhiber leur prolifération ; c'est le cas par exemple de p53 et pRb, fréquemment perdus ou mutés dans les cancers.

- **L'échappement à la mort cellulaire programmée par apoptose**

L'un des mécanismes de sauvegarde permettant l'élimination de cellules inappropriées à la fois au cours du développement embryonnaire et de l'échappement tumoral est la mort cellulaire programmée, plus précisément l'apoptose. De nombreuses études ont montré que l'accumulation d'altérations permettant aux cellules de résister à l'apoptose était un avantage sélectif crucial pour les cellules tumorales.

- **Un potentiel répliatif illimité**

Les cellules normales ont un potentiel répliatif limité ; au bout d'un certain nombre de divisions, elles entrent en senescence. Ce phénomène est associé à la longueur des télomères ; en effet, les extrémités des chromosomes sont raccourcies à chaque division. L'ajout de motifs d'ADN répétés au bout des télomères est effectué par une enzyme, la télomérase, qui n'est généralement

pas exprimée dans une cellule normale (sauf exceptions). Dans 90% des cellules immortalisées, cette enzyme est à nouveau active, permettant ainsi aux cellules de passer outre la limite de divisions cellulaires.

- **Une angiogénèse maintenue**

Dans un organisme adulte, les mécanismes de vasculature (établis durant l'embryogénèse) sont généralement quiescents ou actifs de manière transitoire (lors d'une blessure ou du cycle menstruel). Or, comme tout tissu, les tumeurs ont besoin d'être alimentées en nutriments et en oxygène, mais également de pouvoir libérer leurs déchets métaboliques ainsi que le CO₂ qu'elles produisent ; il existe donc une néovascularisation tumorale liée à la réactivation d'un ensemble de facteurs permettant l'angiogénèse [7]. Bien que suffisants, ces vaisseaux sanguins tumoraux demeurent néanmoins assez chaotiques.

- **Une capacité d'invasion tissulaire et de métastases**

Ce phénomène consiste en une capacité de changements morphologiques permettant aux cellules tumorales de se détacher de leur comparses, puis de passer dans le sang et les vaisseaux lymphatiques via un processus d'intravasation, afin d'aller se nicher dans un tissu distant (par un processus inverse d'extravasation) avant de croître et de former des lésions micro puis macro-métastatiques sur ce site. Le processus lié à l'obtention par les cellules de ces capacités demeure controversé ; certains montrent qu'il résulte d'un ensemble d'étapes appelées cascade invasion-métastases [8], d'autres montrent que ce processus peut être mis en place de manière bien plus précoce dans le développement tumoral [9] par l'intervention de protéines inductrices de la transition épithéli-mésenchymateuse.

- **Une inflammation locale pro-tumorale**

Dans un contexte non pathologique, l'inflammation est un processus immunitaire permettant l'élimination locale d'un pathogène ou d'une cellule infectée/ anormale. Elle fait intervenir un grand nombre de cytokines, chémokines et d'autres facteurs (de croissance, de survie etc...) qui, dans un contexte tumoral, peuvent faciliter l'angiogénèse, l'invasion tumorale etc...

- **Un métabolisme énergétique adapté**

La prolifération chronique des cellules tumorales nécessite de l'énergie. Dans des conditions aérobies normales, les cellules transforment le glucose en pyruvate dans le cytosol (on parle de glycolyse), puis en CO₂ dans la mitochondrie ; en conditions anaérobies, la glycolyse est favorisée, réduisant ainsi la quantité de pyruvate déposée à la mitochondrie. Or, les cellules tumorales favorisent la glycolyse, indépendamment de la présence d'oxygène. Ce phénomène, à priori contre-productif, puisqu'environ 18 fois moins producteur en ATP, permettrait de favoriser l'expression d'oncogènes, mais également de faciliter la synthèse de macromolécules, et d'organelles, nécessaires à la formation de nouvelles cellules.

- **Echappement à l'immunosurveillance**

L'hypothèse explicitée pour expliquer l'existence de tumeurs dans un contexte d'immunosurveillance efficace et permanent est que les cellules hautement immunogènes sont éliminées au fur et à mesure tandis que les cellules faiblement immunogènes passent la surveillance immunitaire, se développent et forment des tumeurs solides. A l'inverse, lorsque l'on injecte des cellules tumorales à des souris immunodéprimées, la pression sélective liée au système immunitaire est absente, facilitant ainsi le développement tumoral. Afin de simplifier les problématiques liées aux cancers que j'étudie, je ne mentionnerai pas le rôle des virus tumorigéniques dans l'échappement à l'immunosurveillance.

L'ensemble des altérations précédemment décrites sont fréquemment associées à des mutations et délétions, il semble important de mieux comprendre comment une cellule peut acquérir ces anomalies.

1.1.3 Mutations, instabilité chromosomique

1.1.3.1 Les mutations

Chaque être humain adulte est composé d'environ 60 mille milliards de cellules, et subira au cours de sa vie environ 10 millions de milliard de divisions cellulaires. Chaque jour, 200

milliards de cellules se divisent, et autant meurent. De plus, l'intégrité de l'ADN est constamment mise à l'épreuve par un ensemble de facteurs capables d'altérer directement la séquence d'ADN ou de causer des mutations lors de la réparation. Ces facteurs peuvent être séparés en deux catégories : endogènes et exogènes (**Tableau 1**).

| Dommages à l'ADN endogènes | Lésion générées | Lésions par cellule par jour | |
|--|--------------------------------|-------------------------------------|----------------------------|
| Dépurination | Site AP | 10 000 | |
| Désamination des cytosines | transition de base | 100 à 500 | |
| Méthylation des CpG (induite par SAM) | 3meA | 600 | |
| | 7meG | 4000 | |
| | O ⁶ meG | 10 à 30 | |
| Oxydation | 8oxoG | 400-1500 | |
| Dommages à l'ADN exogènes | Dose d'exposition (mSv) | Lésion générées | Lésions par cellule |
| Lumière du soleil (pics) | | dimères pyrimidiques | 100 000/j |
| Fumée de cigarette | | Adduits à l'ADN | 45 - 1029 |
| Rayons X (buste ou dents) | 0,005 à 0,02 | CDBs | 0,0002 - 0,0008 |
| Mammographie | 0,4 | CDBs | 0,016 |
| Scanner du corps ou de la tête | 2 - 7 | CDBs | 0,08 - 0,28 |
| Angioplastie coronarienne | 22 | CDBs | 0,88 |
| TEP scan (¹⁸ F) | 10 | CDBs | 0,4 |
| Traitement à l'I ¹³¹ | 70 - 150 | CDBs | 2,8 - 6 |
| Radiothérapie | 1800 - 2000 | CDBs | 72 - 80 |
| Voyage en avion | 50 | CDBs | 0,0002/h |
| Accident de Tchernobyl | 300 | CDBs | 12 |
| Bombes atomiques Hiroshima et Nagasaki | 5 - 4000 | CDBs | 0,2 - 160 |

Tableau 1 : Lésions de l'ADN d'origines endogènes et exogènes. Adapté de [14].

En effet, même lorsqu'une cellule n'est pas en état de stress, l'ADN subit une pléthore d'altérations spontanées provoquée par l'instabilité chimique intracellulaire [10]; par exemple, le métabolisme cellulaire normal génère des « reactive oxygen species » (ROS) qui peuvent oxyder les bases d'ADN, et causer des cassures simple brin (CSB) [11]. Une mauvaise incorporation de deoxyribonucleoside 5'-triphosphate (dNTP) durant la réplication de l'ADN est potentiellement mutagène, tout comme l'interconversion par désamination de deux bases, la perte de base d'ADN après dépurination, la modification des bases par alkylation etc...

D'autres facteurs externes jouent également un rôle dans l'induction de lésions à l'ADN. Par exemple, on estime que les rayons U.V du soleil induisent des dimères de pyrimidine [12]. Si ces dimères demeurent non réparés, ils seront sensibles à la désamination, remplaçant alors une cytosine par une thymidine. De la même manière, les radiations ionisantes (comme celles de la lumière du soleil) peuvent induire des cassures simple et double brin de la double hélice d'ADN. Si ces altérations ne sont pas correctement réparées, elles peuvent induire elles aussi des mutations et donc d'importants réarrangements structurels du génome. Les facteurs environnementaux liés aux dommages à l'ADN sont également nombreux ; ils incluent notamment la consommation de tabac [13], l'exposition aux produits chimiques (gaz moutarde par exemple), ou à des médicaments, en particulier des chimiothérapies comme le cisplatine, le carboplatine, ou la mitomycine C qui induisent des liaisons covalentes entre les bases d'ADN, ou le temozolomide, qui permet l'attachement de groupes alkyl sur les bases azotées [14].

Il est donc estimé qu'une cellule peut subir 100 000 lésions spontanées d'ADN par jour [12]. A raison de 100 000 lésions par jour sur chacune de nos 60 000 milliards de cellules, il semble aisé de comprendre l'importance majeure des systèmes de réparation et de surveillance de l'ADN dans le maintien de l'intégrité du génome. Ces mécanismes sont communément nommés systèmes de réponse aux dommages à l'ADN (DDR), et permettent la détection des dommages à l'ADN, le recrutement de facteurs de réparation ainsi que la réparation physique de la lésion **(Figure 2)**.

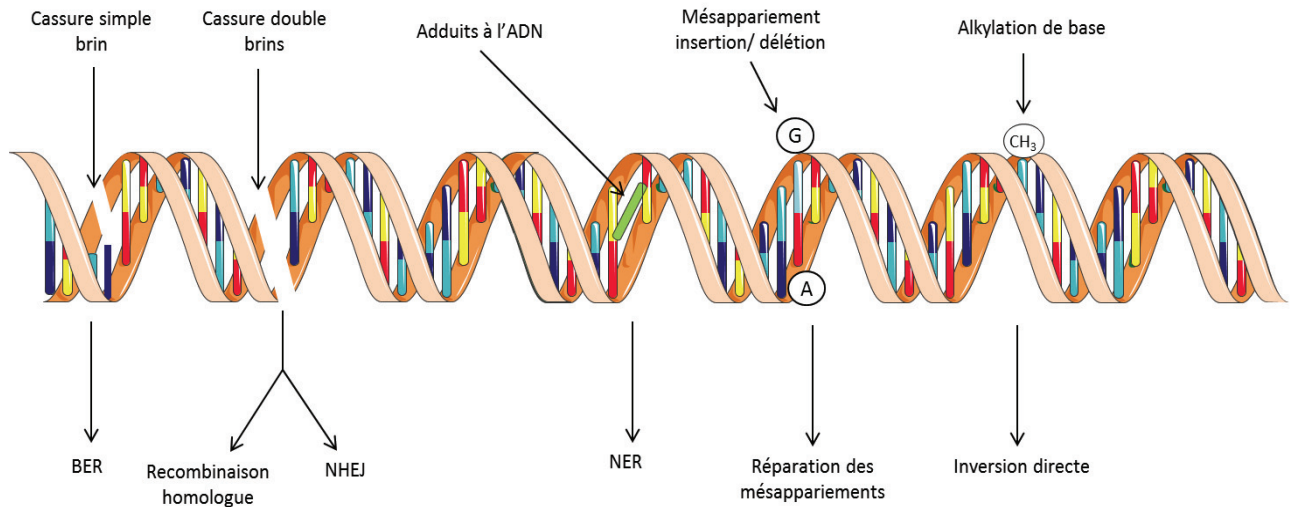


Figure 2. Les systèmes de réparation de l'ADN Adapté de [11].

La plupart des changements subtils de l'ADN, tels que les lésions oxydatives ou les CSB sont réparées par un mécanisme appelé « Base excision Repair » (BER). Les bases azotées endommagées sont retirées de la double hélice, puis la zone touchée de l'ADN est excisée et remplacée par de l'ADN néosynthétisé [10] [15]. Lorsque les CSB induisent une distorsion de la structure double hélice, le processus impliqué dans la réparation est le « nucleotide excision repair », ou NER [16] ; l'ADN entourant la lésion est excisé et remplacé à l'aide de la machinerie répliquative de l'ADN. L'ensemble de ces processus de réparations, lorsqu'ils sont altérés, sont associés à l'émergence de néoplasies [10].

Les mécanismes majeurs impliqués dans la réparation des CDB sont la recombinaison homologue ainsi que la jonction d'extrémités non homologues (NHEJ) [17]. La recombinaison homologue est un processus conservatif permettant de restaurer la séquence d'ADN originale au niveau du site endommagé, et se fait principalement durant les phases S et G2 du cycle cellulaire. Une partie de la séquence entourant la CDB est retirée, et la séquence d'ADN utilisée comme motif pour la néosynthèse est celle de la chromatide sœur [18].

Contrairement à la recombinaison homologue, le mécanisme de NHEJ permet la réparation directement en effectuant une ligature des deux brins cassés. Ce procédé, bien que plus simple, peut introduire plus d'erreurs sur les zones réparées.

La réparation de mésappariements est un mécanisme majeur des DDR impliqué dans la réparation des erreurs liées à la réplication de l'ADN (durant la phase S).

Lorsqu'un mauvais dNTP est incorporé sur l'ADN, ou qu'une boucle insertion/délétion est formée durant la phase répliative, la structure double hélice de l'ADN peut être déformée ; l'ADN néosynthétisé va alors être excisé puis resynthétisé.

Enfin, la synthèse translésion et l'échange de motif permet à la réplication de se poursuivre même en présence de lésion de l'ADN qui induirait en temps normal un arrêt de réplication ; on parle alors de tolérance aux dommages à l'ADN [19]. Lors de la synthèse translésion, les polymérase permettant une synthèse de haute-fidélité sont remplacées par des polymérase particulières regroupées sous le nom de TLS (translesion synthesis) polymérase, capables de synthétiser de l'ADN en utilisant un brin-motif englobant la lésion. Contrairement aux polymérase répliative classiques, les polymérase TLS n'ont pas d'activité exonucléase intrinsèque permettant la relecture, et contiennent des sites actifs plus grands et donc actifs même en cas de mésappariement de bases ou lorsque la double hélice est altérée par distorsion [20], [21], [22]. Une fois que la fourche de réplication a passé la zone lésée, la polymérase est à nouveau remplacée et la synthèse d'ADN reprend son cours normal. Lors de l'échange de motif, la lésion de l'ADN est contournée au niveau de la fourche de réplication, simplement en laissant un trou dans la synthèse d'ADN opposée à la lésion. Après passage de la fourche de réplication, ce trou simple brin est réparé en utilisant une chromatide sœur, de manière similaire au processus observé lors de la recombinaison homologue [11].

Il est important de garder en tête l'importance majeure de TP53, le gardien de l'intégrité du génome, qui coordonne l'ensemble des actions menant aux différents mécanismes de réparation de l'ADN [23].

1.1.3.2 Instabilité chromosomique

La perte d'ADN télomérique génère une instabilité caryotypique ainsi que des amplifications et délétions de segments chromosomiques, en particulier dans les cellules épithéliales. En absence de TP53, le médiateur clé de la réponse aux télomères dysfonctionnels, la mort cellulaire ainsi que l'arrêt du cycle cellulaire peuvent être altérés, ce qui permettrait la survie cellulaire dans un

contexte de raccourcissement des extrémités chromosomiques. Ce phénomène induit une instabilité chromosomale par l'induction de cycles de fusion/ pontage et rupture chromosomiques, même lorsque les cellules ont une activité télomérase (85 à 90% des cellules tumorales) [24].

De plus, les processus impliqués dans la réplication ainsi que la ségrégation des chromosomes durant la mitose, comme la condensation de l'ADN, la cohésion des chromatides sœurs, la formation des centrosomes etc... nécessitent un certain nombre de points de contrôle faisant intervenir un grand nombre de gènes. Les altérations de ces voies sont largement observées dans les cancers, et induisent une instabilité chromosomique [25] (**Figure 3**).

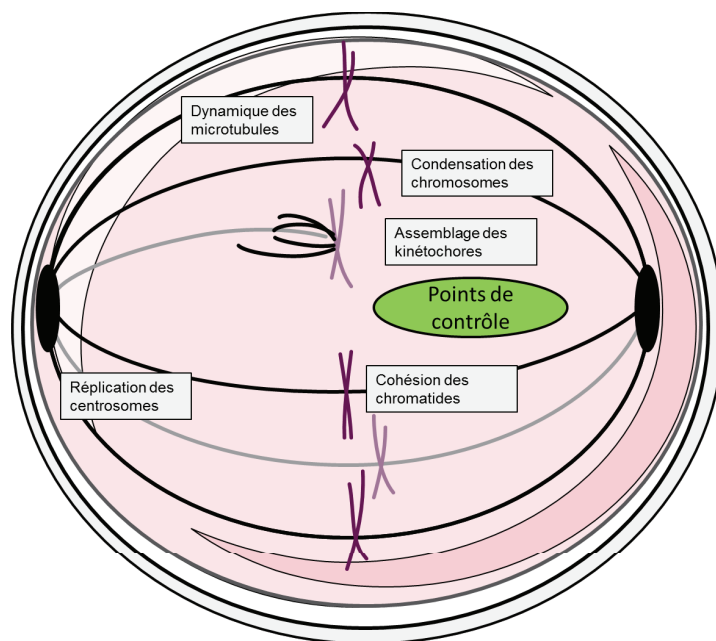


Figure 3. Processus cellulaires impliqués dans la réplication et la ségrégation des chromosomes pendant la mitose ; adapté de [25]. La mitose fait intervenir une condensation des chromosomes, la cohésion des chromatides sœurs ainsi que la formation et dynamique des centrosomes/microtubules. Les points de contrôle nécessaires à ce processus vérifient notamment le fuseau mitotique (qui assure l'alignement des chromosomes avant l'anaphase), ainsi que les dommages à l'ADN (qui empêchent les cellules abimées à entrer en prophase). Lorsque des anomalies surviennent dans ces systèmes de surveillance, une instabilité chromosomique peut survenir.

En 2015, un article publié dans Science mettait en avant le simple fait que si la plupart des tissus peuvent servir de niche au développement tumoral, leur fréquence d'apparition n'est pas répartie de manière égale. Après l'étude du nombre de divisions des cellules normales capables d'auto-renouvellement et responsable de l'homéostasie tissulaire (les cellules souches normales) au cours de la vie, ils suggèrent que seulement 1/3 des variations associées au risque de survenue des cancers sont attribuables à des facteurs environnementaux et de prédispositions génétiques. Ainsi, la majorité des occurrences de cancers seraient dues à la « malchance » de survenue de mutations aléatoires pendant la réplication de l'ADN de cellules souches normales et non cancéreuses [26].

1.1.4 Modélisation « drivers » et « passengers »

Tous les cancers résultent de changements de l'ADN de cellules cancéreuses. Mais l'inverse n'est pas absolu : les anomalies somatiques observées dans une cellule cancéreuse ne sont pas toutes directement impliquées dans le développement de ce cancer. Ce principe est résumé dans les termes «drivers» et «passengers» (conducteurs et passagers) [3].

Une mutation « conductrice » confère un avantage sélectif aux cellules, et favorise de manière directe le développement tumoral. Une mutation « passagère » n'a pas été directement sélectionnée, n'a pas conféré d'avantage clonal ni contribué de manière directe au développement cancéreux. L'hypothèse formulée est que ces dernières sont observées dans les cellules tumorales car les mutations somatiques sans conséquences fonctionnelles sont fréquemment induites durant la division cellulaire. Ainsi, une cellule qui acquiert une mutation « conductrice » aura donc très probablement accumulé auparavant un ensemble de mutations inertes dans son génome. Ces dernières seront conservées durant l'expansion clonale, et donc observées dans les tumeurs. Les séquençages à l'échelle du génome, permettront probablement de mieux distinguer les mutations conductrices, fréquemment distribuées dans les diverses populations tumorales au sein d'un grand nombre d'individus des mutations passagères, distribuées plutôt de manière stochastique [27]. On considère à l'heure actuelle qu'il existe environ 140 gènes « drivers » fréquemment altérés dans les cancers, ce chiffre ne comprenant que les gènes identifiés comme mutés, délétés etc... Il existe une autre grande catégorie d'altérations qui perturbe l'expression des gènes, il s'agit de l'épigénétique. Si un gène est fréquemment épigénétiquement altéré dans les cancers,

conférant alors un avantage sélectif aux cellules cancéreuses, on parle alors de gène « épigénétique ».

1.1.5 Cancer et thérapeutique : exemples du sein et du poumon.

1.1.5.1 Sein

1.1.5.1.1 Quelques chiffres

Les tumeurs mammaires représentent 16% de l'ensemble des cancers féminins, faisant de lui le cancer le plus fréquent chez les femmes. En 2004, on estime à 519 000 le nombre de femmes qui sont mortes de ce cancer, la plupart des décès survenant dans les pays en développement (Figures 4 et 5).

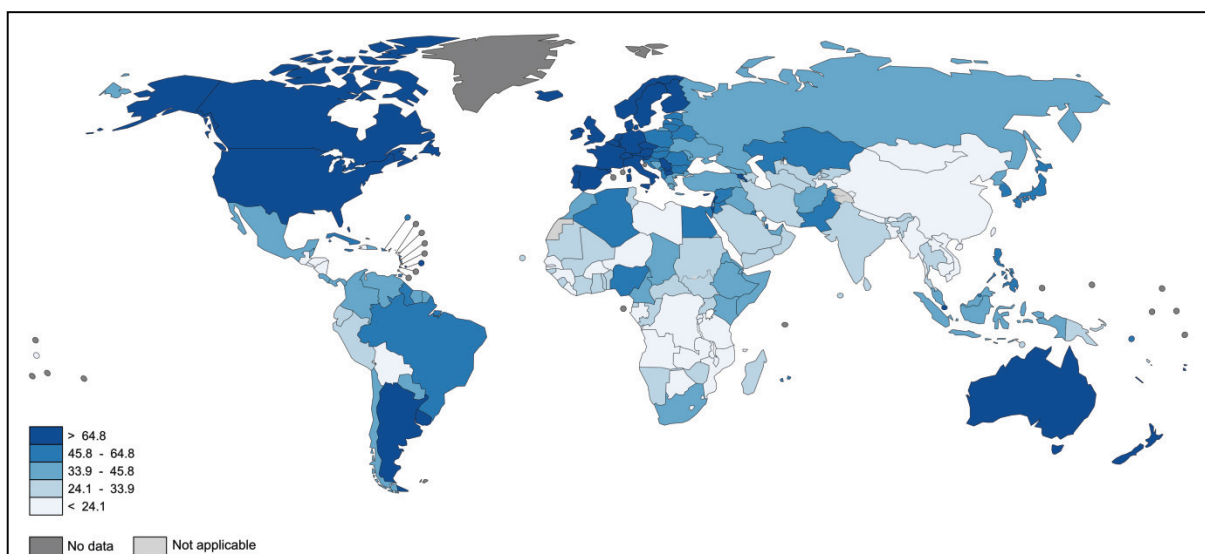


Figure 4 : Incidence des cancers mammaires dans le monde (selon Globocan, OMS 2012).

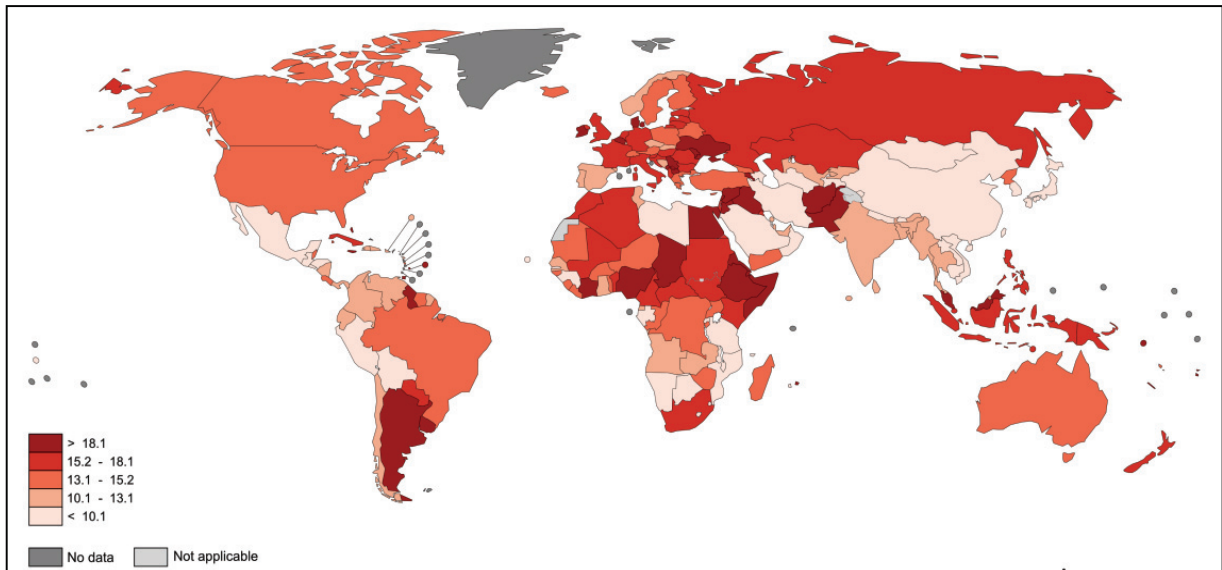


Figure 5 : Mortalité des cancers mammaires dans le monde (selon Globocan, OMS 2012).

L'incidence varie énormément dans le monde, et peut atteindre 99,4 pour 100 000 en Amérique du Nord. L'Europe orientale, l'Amérique du Sud, l'Afrique du Sud et l'Asie occidentale ont des taux d'incidence modérés, bien qu'en hausse. Les taux d'incidence les plus faibles sont observés en Afrique et en Chine, bien qu'ils soient également en hausse.

Etonnamment, le lien direct entre incidence et mortalité n'est pas intuitif ; en effet, le taux de survie relatif à la survenue d'un cancer du sein est extrêmement variable d'un pays à l'autre (de 40% dans les pays les plus pauvres à 80% dans des pays plus riches) [28]. La corrélation entre PIB et mortalité peut s'expliquer essentiellement par l'absence de dépistage précoce et d'accès à des infrastructures et traitements appropriés dans ces pays, ce qui aboutit à une proportion plus élevée de femmes présentant des stades avancés du cancer.

1.1.5.1.2 Le cancer du sein, définition

1.1.5.1.2.1 Physiologie mammaire

Chez les mammifères, les seins permettent d'allaiter les nouveaux nés. Chez la femme, ce tissu est composé d'une glande subdivisée en 12 à 20 lobes maintenus et séparés par des tissus conjonctifs et adipeux. Chaque lobe est composé de lobules (tissu conjonctif intralobulaire, avec 10-100 acini) reliés aux canaux galactophores qui se rejoignent au niveau du mamelon. Le développement de la glande mammaire est fractionné en plusieurs étapes de différenciation durant

la vie d'une femme, et est sous l'influence directe d'hormones ovariennes et hypophysaires. Ces étapes sont donc naturellement associées aux changements hormonaux féminins, notamment la puberté, la grossesse, l'allaitement et la ménopause (**Figure 6**).

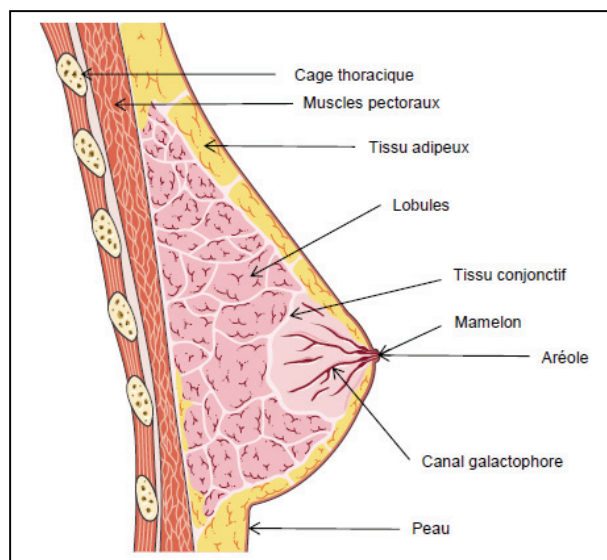


Figure 6 : Coupe schématique du sein, de profil. Les seins sont reliés au thorax au niveau des muscles pectoraux. Le sein est essentiellement composé de tissu adipeux qui permet d'entourer et maintenir la glande mammaire. Celle-ci est constituée de lobules permettant la production du lait qui va être acheminé jusqu'au mamelon par les canaux galactophores. Le réseau glandulaire est vascularisé et comprend également un réseau lymphatique.

1.1.5.1.2.1.1 Anatomopathologie du cancer du sein

Dans 99% des cas, le cancer du sein correspond à des carcinomes d'origine épithéliale, les 1% restants correspondant à des sarcomes provenant du tissu conjonctif. Les tumeurs sont classées selon leur diversité cellulaire. L'examen anatomopathologique, basé sur l'analyse morphologique et moléculaire, permet d'identifier les types de lésions majoritaires (entre 50 et 90% de la masse tumorale), et associées (10% de la masse tumorale). Si les anomalies cellulaires sont observées au niveau des canaux galactophores, on parle alors de carcinome canalaire (cela représente 2 cas sur trois), contrairement aux carcinomes lobulaires associés à des lésions au niveau des lobules (1/3 des cas). Lorsque les cellules n'ont pas envahi le tissu conjonctif, on parle de carcinome *in situ* ; à l'inverse, lorsque les cellules tumorales sont observées dans le tissu conjonctif, et donc ont perforé la lame basale de l'épithélium de la glande mammaire, on parle de carcinome infiltrant. L'infiltration maligne est un critère majeur dans le suivi des patientes. En effet, un carcinome *in*

situ est généralement associé à un bon pronostic ; de plus, le type de carcinome compte, puisque dans le cas des carcinomes lobulaires *in situ*, 20 à 30% des patientes voient leur pathologie dériver en carcinome infiltrant, plus agressif et de moins bon pronostic (**Figure 7**).

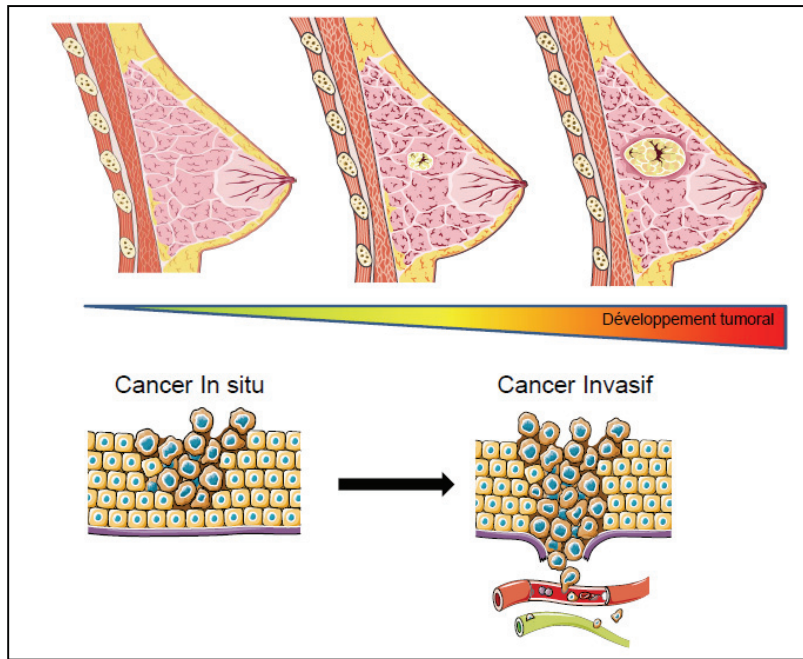


Figure 7 : schéma représentatif du développement de carcinome mammaire.

1.1.5.1.2.1.2 Classification

1.1.5.1.2.1.2.1 Histologique

De manière générale, il existe plusieurs classements des cancers du sein ; les deux plus connues sont la classification de Scarff-Bloom-Richardson (SBR), ainsi que la classification TNM (Taille, nombre de nodules et métastases). La classification SBR prend en compte l'architecture de la glande (nombre de tubes), la recherche d'anomales cytonucléaires (tailles des noyaux) et du nombre de mitoses ; chaque critère étant noté de 1 à 3. Le grade SBR est réalisé sur tous les types histologiques de cancer infiltrant (sauf le carcinome médullaire).

La classification TNM prend en compte la taille des lésions, l'envahissement des ganglions lymphatiques proches ainsi que la présence éventuelle de métastases.

Ces classifications permettent toutes deux d'établir un pronostic afin de définir une prise en charge adaptée en termes de chirurgie, radiothérapie et chimiothérapie.

1.1.5.1.2.1.2.2 Moléculaire

Déterminer les signatures moléculaires d'une tumeur permet d'affiner le pronostic ; en effet, il a été montré que certains sous types moléculaires de tumeurs répondent plus ou moins bien à une chimiothérapie donnée. Cela permettrait donc de favoriser la réponse à un traitement néo-adjuvant tout en limitant les effets secondaires [29].

Il existe 4 sous types moléculaires de cancer du sein [30-32] : Luminal A et B, Her2 amplifié et basal, classés notamment selon l'expression des récepteurs aux oestrogènes (RE). Un cinquième groupe vient compléter le tableau ; il s'agit des tumeurs « Claudin Low », caractérisées par une faible expression des protéines de la famille des claudines et des occludines, impliquées dans les jonctions serrées mais également d'autres molécules d'adhésion. Ce groupe se démarque par le fort taux de résistances aux chimiothérapies et radiothérapies. D'autres nouveaux genres de classifications moléculaires ont vu le jour grâce à l'explosion du séquençage haut débit. En 2012, le consortium international TCGA proposait de nouveaux critères associés aux 4 principaux sous types de tumeurs [33] (**Tableau 2**). Enfin, grâce à la révolution technique en termes de séquençages haut débit, de nouveaux marqueurs moléculaires et puces dédiées sont proposés depuis peu pour différencier en termes de mutations des sous classe les cancers du sein selon leur pronostic, et ainsi adapter les traitements dès la première intention [34-40].

Enfin, certains chercheurs proposent l'hypothèse selon laquelle l'occurrence des cancers mammaires est bimodale, avec un premier pic de fréquence autour de 50 ans et un autre autour de 70 ans. Ils proposent donc de se concentrer sur l'étiologie associée à ces pics, notamment en termes de contexte hormonal [41].

| | Luminal A | Luminal B | Basal | HER2E |
|-------------------------|--|--|---|--|
| % ER+/HER2- | 87% | 82% | 10% | 20% |
| % HER2+ | 7% | 15% | 2% | 68% |
| % TNBC | 2% | 1% | 80% | 9% |
| Voie p53 | TP53 muté (12%) Gain de MDM2 (14%) | TP53 muté (32%) Gain de MDM2 (31%) | TP53 muté (84%) Gain de MDM2 (14%) | TP53 muté (75%) Gain de MDM2 (30%) |
| Voie PIK3CA/PTEN | PIK3CA muté (49%) PTEN muté/perdu (13%) INPP4B perdu (9%) | PIK3CA muté (32%) PTEN muté/perdu (24%) INPP4B perdu (16%) | PIK3CA muté (7%) PTEN muté/perdu (35%) INPP4B perdu (30%) | PIK3CA muté (42%) PTEN muté/perdu (19%) INPP4B perdu (30%) |
| Voie RB1 | Cyclin D1 amplifiée (29%) Gain de CDK4 (14%) Faible expression de CDKN2C Forte expression de RB1 | Cyclin D1 amplifiée (58%) Gain de CDK4 (25%) | RB1 muté/perdu (20%) Cyclin E1 amplifiée (9%) Forte expression de CDKN2A Faible expression de RB1 | Cyclin D1 amplifiée (38%) Gain de CDK4 (24%) |
| Expression d'ARNm | Cluster ER élevé Prolifération faible | Cluster ER plus faible Prolifération forte | Signature basale Prolifération forte | Signature d' amplicon HER2 Prolifération forte |
| Nombre de copies | Principalement diploïdes beaucoup de génomes "silencieux" Gain de 1q, 8q, 8p11 Perte de 8p, 16q Amplification de 11q13.3 (24%) | Principalement aneuploïdes beaucoup d'amplifications focales Gain de 1q, 8q, 8p11 Perte de 8p, 16q Amplification de 11q13.3 (51%) et 8p11.23 (28%) | Principalement aneuploïdes Forte instabilité génomique Gain de 1q, 10p Perte de 8p, 5q MYC focal gain (40%) | Principalement aneuploïdes Forte instabilité génomique gain de 1q, 8q perte de 8p Amplification focale 17q12 ERBB2 (71%) |
| Mutations d'ADN | PIK3CA (49%) TP53 (12%) GATA3 (14%) MAP3K1 (14%) | TP53 (32%) PIK3CA (32%) MAP3K1 (5%) | TP53 (84%) PIK3CA (7%) | TP53 (75%) PIK3CA (42%) PIK3R1 (8%) |
| Méthylation d'ADN | | Phénotypes hyperméthylés pour certains sous-groupes | Hypométhylé | |
| Expression de protéines | Signalisation oestrogènes Forte cmyb élevé Sous types « RPPA réactifs » | Moins de signalisation oestrogènes FOXM1 and cmyc élevés Sous types « RPPA réactifs » | Forte expression des protéines de réparation, signature (p-AKT) avec perte de PTEN et INPP4B | HER1 et HER2 élevés |

Tableau 2 : Tableau résumant les sous types de cancers du sein et leurs signatures moléculaires associées, adaptés de [33].

1.1.5.1.2.2 Traitements

- Chirurgie : permet d'obtenir un diagnostic histologique dans un premier temps, puis d'enlever la tumeur et les aires ganglionnaires.
- Chimiothérapie : indiquées dans la plupart des cas, basées sur des agents
 - intercalants (doxorubicine, epirubicine...), des
 - anti-métabolites (méthotrexate, 5-Fluorouracile...),
 - des agents alkylants (cisplatins, carboplatine ...)
 - anti-microtubulaires (vincristine, paclitaxel...).
- Radiothérapie : indiquée en particulier après exérèse de tumeurs volumineuses inflammatoires avec envahissement ganglionnaire.
- Hormonothérapie : utilisée lorsque les cellules tumorales expriment les récepteurs aux oestrogènes ou progestérone (anti-aromatases et tamoxifène)
- Thérapie ciblée : prescrit lorsque les cellules tumorales expriment l'oncogène HER2/Neu (anticorps : trastuzumab, inhibiteur d'activité tyrosine kinase : Lapatinib).

1.1.5.2 Poumons

1.1.5.2.1 Chiffres

Chez l'homme, les cancers du poumon représentent la localisation de cancer la plus fréquente dans le monde. C'est aussi la première cause de mortalité par cancer dans le monde. Son incidence augmente de 3 % par an depuis 15 ans, en particulier chez la femme et chez les sujets jeunes, et est coordonnée à l'évolution de la consommation de tabac (**Figure 8**).

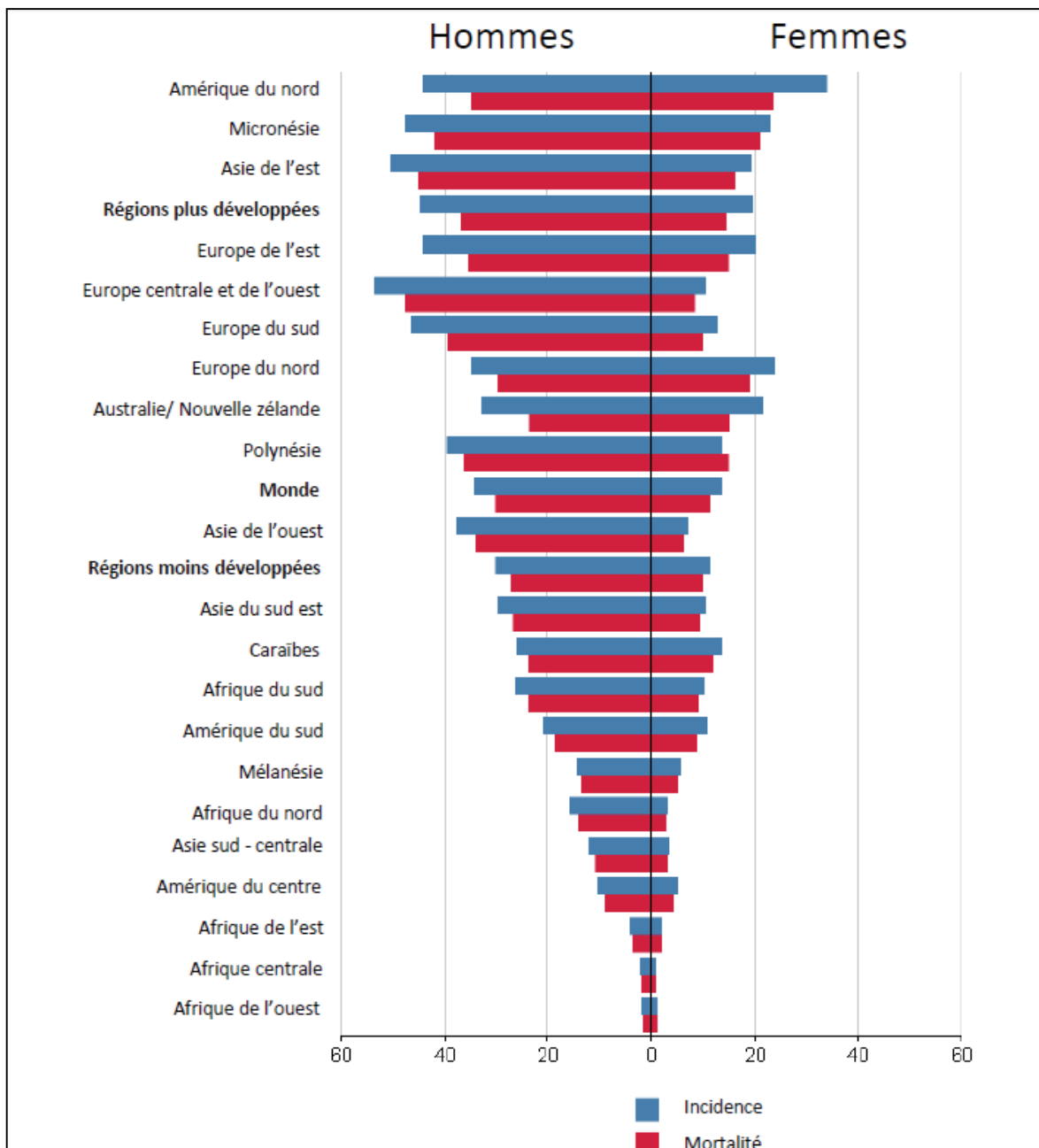


Figure 8 : Incidence et mortalité liées au cancer du poumon, source Globocan (IARC 2012).

1.1.5.2.2 Physiologie pulmonaire

Les poumons permettent l'échange d'oxygène et de dioxyde de carbone entre un organisme et son environnement. Les cellules humaines tirent la plus grande part de leur énergie de réactions

chimiques par l'utilisation de l'oxygène. De plus, il faut que les cellules puissent éliminer le CO₂ qu'elles produisent, et qui représente l'un des métabolites principaux à l'issue du métabolisme oxydatif.

Il existe deux poumons, droit (3 lobes séparés par deux scissures) et gauche (2 lobes séparés par une scissure). Chaque lobe possède une bronche et des bronchioles, elles même subdivisées jusqu'aux bronchioles, qui se terminent sur les alvéoles (300 millions de petits sacs d'airs qui permettent les échanges gazeux avec le sang) (**Figure 9**).

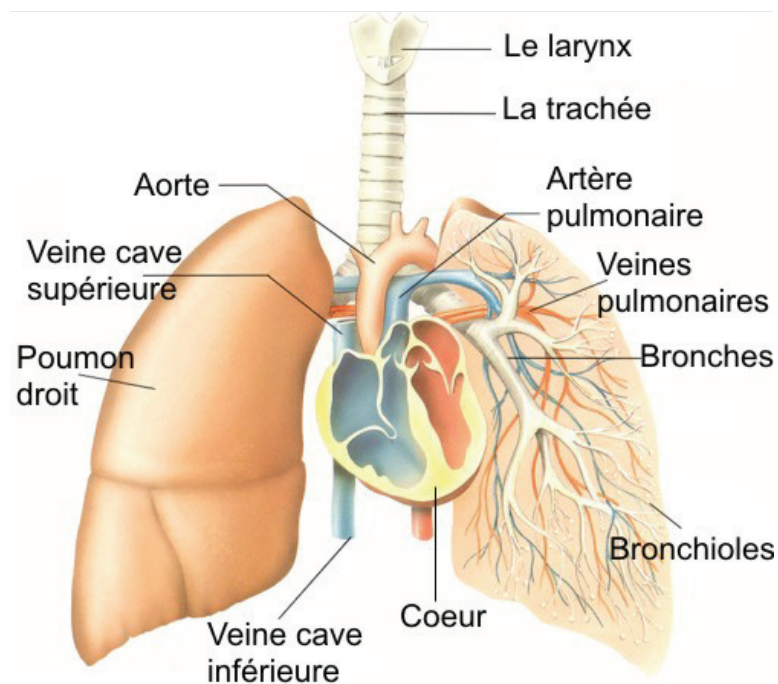


Figure 9 : Structure d'un poumon.

1.1.5.2.3 Anatomopathologie du cancer du poumon

Les différents types de cancers du poumon se développent à partir des cellules des bronches, ou des cellules tapissant les alvéoles pulmonaires. Il existe deux principaux types de cancer du poumon :

- Le cancer du poumon non à petites cellules ou NSCLC (Non Small Cell Lung Cancer) est le plus fréquent et comporte plusieurs sous types :
 - Les cancers épidermoïdes (30 %), localisés dans les parois internes des grosses bronches.
 - Les adénocarcinomes (ADK) (30 à 40%), localisé dans les zones périphériques du poumon, particulièrement au niveau des lobes supérieurs et proche de la plèvre.
 - Les cancers à grandes cellules indifférenciées (10%), se développant près de la surface externe des poumons.
- Le cancer du poumon à petites cellules ou SCLC (Small Cell Lung Cancer), plus rare, environ 13 % des cas.
- Autres formes rares (<10% des cancers du poumon) : tumeurs carcinoïdes, cylindromes et tumeurs muco-épidermoïdes.

1.1.5.2.3.1 Classification

1.1.5.2.3.1.1 Histologique

Comme pour le sein, il existe une classification TNM des cancers des poumons, permettant d'évaluer le stade de la maladie. Il comporte trois critères principaux : la taille de la tumeur, l'invasion des ganglions adjacents ainsi que la détection de métastases (**Tableau 3**), et permet de déterminer un stade de gravité de la pathologie, numéroté entre 1 et 4 (**Tableau 4**).

| TUMEUR = T | GANGLION = N | Métastase = M |
|---------------------------------------|---|--|
| T0 : pas de tumeur primitive | N0 : pas d'atteinte des ganglions régionaux | M0 : pas de métastase |
| Tis : carcinome <i>in situ</i> | N1 : ganglions périphériques proches atteints | M1a : métastase observée dans le thorax |
| T1 | N2 : ganglions périphériques atteints | M1b : 1 métastase extra-thoracique |
| - T1a < 1 cm | N3 : ganglions périphériques proches et peu proches atteints | M1c : métastases extra-thoraciques |
| - T1b 1 à 2 cm | | |
| - T1c 2 à 3 cm | | |
| T2 | | |
| - T2a 3 à 4 cm | | |
| - T2b 4 à 5 cm | | |
| T3 : 5 à 7 cm | | |
| T4 > 7 cm | | |

Tableau 3 : critères de classification TNM des cancers du poumon.

| Stade | Tumeur (T) | Ganglions régionaux (N) | Métastase(s) (M) |
|-------|-----------------|-------------------------|------------------|
| 0 | Tis | N0 | M0 |
| IA | T1 | N0 | M0 |
| IB | T2a | | |
| IIA | T2b | N0 | M0 |
| | T1a, b | N1 | |
| | T2a | N1 | |
| | T2b | | |
| IIB | T2b | N1 | M0 |
| | T3 | N0 | |
| IIIA | T1a, b T2a,b | N2 | M0 |
| | T3 | N1, N2 | |
| | T4 | N0, N1 | |
| IIIB | T4 | N2 | M0 |
| | Tout T | N3 | |
| IV | Tout T | Tout N | M1a, b |

Tableau 4 : détermination du stade de la maladie par l'intermédiaire des grades TNM.

1.1.5.2.3.1.2 Moléculaire

On observe des inactivations généralement mutuellement exclusives de GST tels que TP53 (80% des cas), RB1 (70%), PTEN (15%), ou plus rarement une activation d'oncogènes tels que KRAS (25% des ADK), EGFR ou MYC (20% des cas), PIK3CA/ AKT/ mTOR (<10% des cas). Dans les ADK, on peut également observer des translocations de gènes tels que RET, ALK et ROS1, ainsi que des amplifications ou surexpression du proto-oncogène MET.

Déterminer au mieux le stade d'évolution de la maladie est essentiel afin de choisir la meilleure stratégie thérapeutique.

En pratique, la détection d'altérations d'EGFR et de ALK sont utilisées en standard, mais d'autres marqueurs sont apparus grâce à l'évolution des technologies haut débit et devraient compléter le panel de test de marqueurs d'altérations ; c'est le cas notamment de ROS, MET ou KRAS sous certaines conditions [42-45, 40].

1.1.5.2.4 Traitements

Si la tumeur est locale, le traitement principal est la chirurgie. Dans les cas métastatiques, le traitement principalement utilisé est alors la chimiothérapie et/ou la radiothérapie.

- Chirurgie : Lorsque la tumeur est retirable, une exérèse est pratiquée. Elle peut concerner un segment de lobe (segmentectomie, tumeurs de 2 cm maximum non métastasées), un ou 2 lobes entiers (lobectomie, tumeurs de moins de 3 cm et ganglions atteints), ou d'un poumon complet (lorsque la tumeur a envahi des tissus adjacents comme la plèvre, peu pratiqué).
- Radiothérapie : ce traitement peut être :
 - Exclusif pour les tumeurs de stade 1,
 - Néo-adjuvant pour diminuer la taille de la tumeur avant exérèse
 - Adjuvant pour les patients ayant subi une résection
 - Associé à une chimiothérapie.
- Chimiothérapie :
- *Cancers épidermoïdes* : principalement cisplatine et carboplatine, peuvent être associés à différentes molécules :
 - Alcaloïdes (Paclitaxel, docétaxel) : empêche la dépolymérisation des microtubules

- Anti-mitotiques (Vinorelbine) : bloque la mitose en empêchant la polymérisation des microtubules lors de la division cellulaire
- Analogues de désoxycytidine (gemcitabine) : antimétabolite pyrimidique, bloque la synthèse d'ADN lors de la phase S.
- *Cancers non épidermoïdes* : en plus de la cisplatine les patients peuvent être traités avec :
 - Pemetrexed (un analogue d'acides folique qui inhibe la synthèse des bases puriques (adénine et guanine) et pyrimidiques (cytosine, thymine).
- Thérapie ciblée :
 - Il existe une thérapie ciblant la voie du récepteur de « l'Epidermal Growth Factor » (EGFR). La mutation de ce récepteur est observée dans 84% des ADK et 65% patients atteints de NSCLC. Les mutations activatrices de ce récepteur induisent une addiction oncogénique, et peuvent être traitées à l'aide d'inhibiteur de cette voie (Erlotinib, afatinib et géfitinib).
 - Avastin, un anticorps monoclonal anti-VEGF qui sert d'anti-angiogénique (si le récepteur de l'EGF est muté).
 - Le gène de fusion EML4-ALK correspond à une translocation (inversion q2) induisant l'expression d'un oncogène : une protéine chimérique à activité kinase qui induit la prolifération cellulaire et inhibe l'apoptose. Ce gène de fusion induit une addiction oncogénique, et représente donc une cible thérapeutique pertinente. Ce réarrangement chromosomique est observé chez 5% des patients atteints d'ADK. Il existe des inhibiteurs de cette mutation : le crizotinib et le ceritinib, qui inhibent l'activité tyrosine kinase de la protéine de fusion, entraînant la mort par apoptose. Il est intéressant de noter qu'ALK est également un récepteur à dépendance [46].

Les mécanismes génétiques de mutations, d'altérations du nombre de copies, d'insertions, de délétions et de recombinaisons sont particulièrement adaptés à l'idée de changements phénotypiques persistants. C'est la raison pour laquelle les cancers ont été décrits pendant longtemps comme des maladies basées sur des altérations génétiques. Néanmoins, les événements génétiques sont rares et ne représentent donc pas un moyen efficace pour promouvoir

la transformation maligne, même si certaines cellules cancéreuses surmontent cet obstacle en acquérant des défauts de réparation de l'ADN, promouvant ainsi les mutations.

Les mécanismes de contrôle épigénétiques offrent une voie alternative d'obtention de caractères oncogéniques stables. Bien qu'ils persistent durant plusieurs divisions cellulaires, les états épigénétiques sont flexibles, et ont une forte influence sur le phénotype cellulaire.

Bien que les cellules cancéreuses soient connues pour leurs altérations épigénétiques depuis longtemps, ce n'est que récemment que de fréquentes mutations de régulateurs épigénétiques ont été découvertes, et que l'ampleur des modifications du paysage épigénétique dans les cellules cancéreuses est mieux caractérisée [47, 48]. Il est désormais établi que les mécanismes épigénétiques s'influencent entre eux et « travaillent » en coopération pour favoriser l'émergence de caractéristiques cancéreuses [49]. Mais quels sont-ils, à quoi servent-ils et comment les étudier ?

1.1.6 L'explosion des technologies haut-débit, un petit pas pour l'homme, un grand pas pour la recherche en cancérologie.

Durant ces dix dernières années, le formidable essor des technologies haut débit ont permis d'effectuer de grandes avancées en biologie, et notamment dans la recherche sur le cancer. Des consortia tels que le projet génome humain, le HatMap, le projet ENCODE, ou encore l'atlas du génome des cancers (TCGA) ont vu le jour, et un grand nombre d'études à large échelle sont désormais disponibles en accès libre pour l'ensemble des chercheurs. Ainsi, on peut désormais accéder à de grandes quantités d'informations, entre autres sur le nombre de copies d'ADN, les pertes d'hétérozygotie, l'expression génique, la méthylation de l'ADN, le protéome... de tumeurs issues d'un grand nombre de patients, et ce pour une variété croissante de types tumoraux. De plus, un ensemble de packages, logiciels et autres pipeline se sont également développés afin de faciliter les démarches [50-59].

Un nombre fleurissant de publications contenant des données issues de TCGA par exemple ont pu voir le jour, et la possibilité d'obtenir des analyses complètes de mutations, d'expression

génique ou de méthylation de l'ADN sur de grandes cohortes de patients permet parfois de renforcer la pertinence des résultats quant à la problématique générale.

1.2. Epigénétique, régulation des transcriptomes et dérégulations dans les cancers

1.2.1 Introduction

L'épigénétique est définie comme un ensemble de changements héréditaires d'expression génique qui ne sont pas accompagnés de modification de la séquence d'ADN. En ce sens, la perte d'expression génique induite par des changements de la chromatine est essentielle aux organismes eucaryotes, puisqu'elle permet d'orchestrer un ensemble de processus biologiques clés, dont la différenciation, l'empreinte ou l'inactivation de chromosomes entiers comme par exemple le chromosome X. Chez les vertébrés s'ajoutent à cela les variations de méthylation des cytosines contenues dans les dinucléotides CpG. Comme tout processus biologique, les dérégulations de ce dernier peuvent favoriser ou initier l'émergence de pathologies. L'une des caractéristiques de ce type de régulation transcriptionnelle est qu'elle peut s'étendre sur de larges régions génomiques par coopération de différentes marques épigénétiques telles que les ARN non codants, les modifications de la chromatine, les modifications de la position des nucléosomes ou la méthylation de l'ADN [60, 52].

1.2.2 Organisation de la chromatine et régulation transcriptionnelle

1.2.2.1 Introduction

Les signaux épigénétiques utilisent trois mécanismes distincts : la méthylation de l'ADN, les modifications de la chromatine, et l'ARN non-codant. Les mécanismes épigénétiques permettent à des cellules génétiquement identiques d'atteindre des phénotypes divers et stables en contrôlant la disponibilité transcriptionnelle de diverses parties du génome à travers des marquages et enroulements différentiels de la chromatine. Ces « embellissements » incluent des modifications

directes de l'ADN telles que la méthylation des CpG [61, 62], mais également l'hydroxylation, la formylation, ainsi que la carboxylation [63].

Ils comprennent également le positionnement et l'occupation des nucléosomes [64], les variants d'histones, ainsi que de nombreuses modifications des histones [65], de protéines d'interaction avec les histones [66], et d'ARN non codants [67]. Contrairement aux mutations irréversibles, ces marques ont la capacité de se maintenir et de s'adapter aux changements environnementaux, selon les besoins cellulaires. Cette tâche délicate est accomplie par des « initiateurs », tels que les ARN longs non codants (lnc-RNA), les « writers » qui établissent les marques épigénétiques, les « lecteurs » interprétant ces marques ainsi que les « erasers », qui retirent les marques épigénétiques et les « readers » qui repositionnent les nucléosomes et les « insulateurs », qui délimitent les domaines épigénétiques. Les écrivains sont dirigés vers leur localisation cible par le contexte séquentiel, les marques de chromatine déjà existantes ainsi que les protéines associées, les ARN non codants et/ ou l'architecture nucléaire. Ces marques sont alors reconnues pour des protéines « lectrices » qui convertissent l'information en diverses fonctions cellulaires. La mise en place, la maintenance et les changements des marques épigénétiques sont inter-régulées à l'aide d'une discussion croisée avec les protéines « écrivain » qui guident les changements du paysage épigénétique.

1.2.2.2 Compaction de la chromatine et régulation transcriptionnelle

1.2.2.2.1 Euchromatine et hétérochromatine

Les niveaux de transcriptions du génome sont très variables, et ce sont ces différences qui structurent l'organisation nucléaire. Ainsi, les nucléoles correspondent à la zone de transcription active de l'ADN et présentent une chromatine peu compactée (sous forme de collier de perles). Le reste du génome est organisé soit sous forme d'hétérochromatine (chromatine très compactée), principalement péri-nucléolaire et périphérique, soit sous forme d'euchromatine plus centrale (compaction intermédiaire entre la chromatine nucléolaire et l'hétérochromatine). L'hétérochromatine regroupe la plupart des régions peu transcrites (inter-géniques et gènes non exprimés) tandis que l'euchromatine regroupe des zones plus fortement transcrites. Lorsqu'une

région est toujours située dans l'hétérochromatine quelle que soit le type cellulaire, on parle de d'hétérochromatine constitutive.

Les nucléosomes de l'euchromatine et de l'hétérochromatine diffèrent notamment au niveau de modifications posttraductionnelles des queues d'histones (acétylations, méthylations, phosphorylations, ubiquitinations, biotinylation, ADP-ribosylation, etc... [68] (**Figure 10**).

La régulation épigénétique dépend toujours de la structure de la chromatine, qui constitue la matrice fonctionnelle au sein de laquelle les gènes sont plus ou moins exprimés selon le contexte cellulaire. Ainsi, le remodelage de la chromatine constitue la base essentielle de la régulation génique.

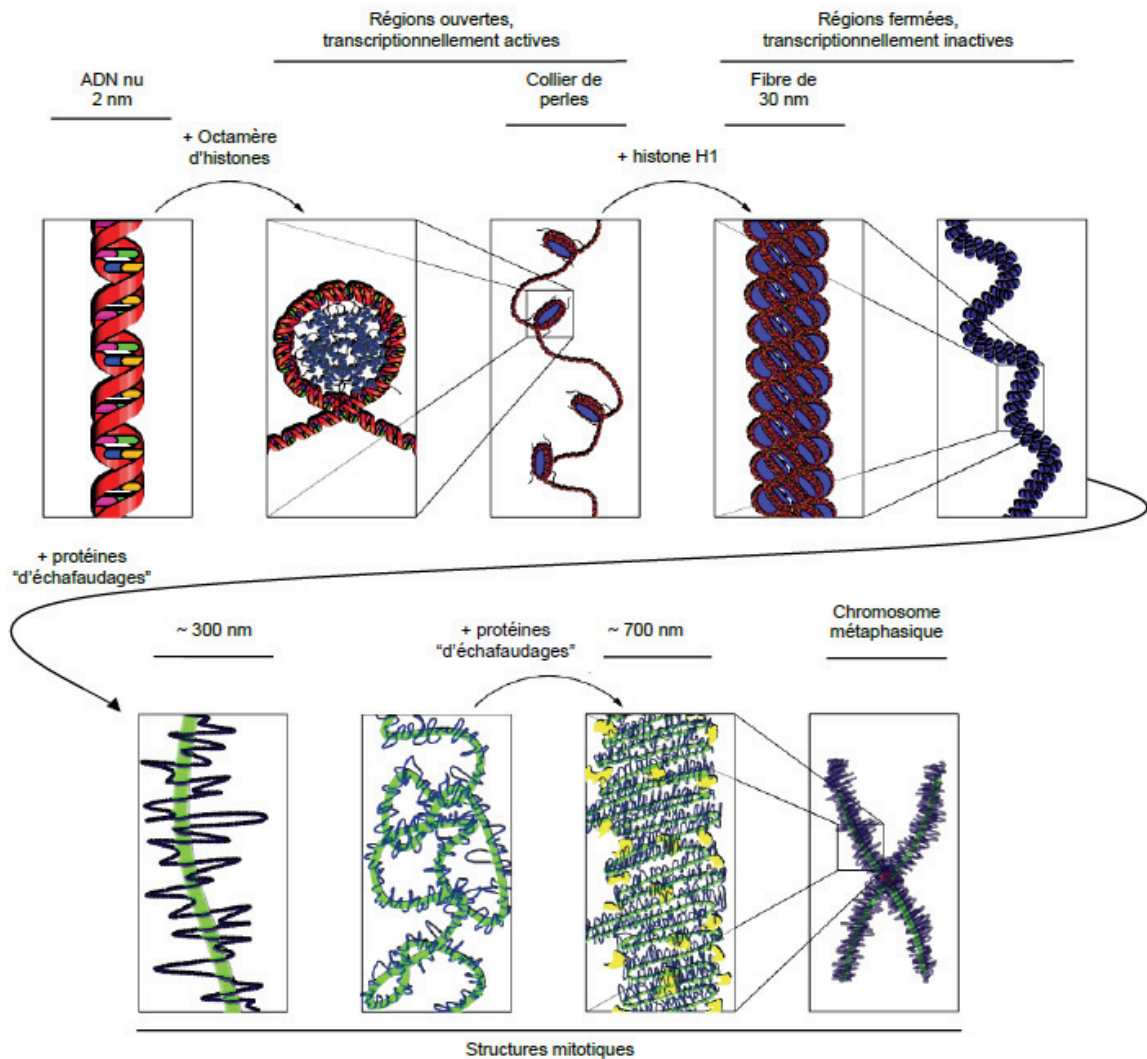


Figure 10 : Etats de compaction de la chromatine. L'ADN nucléaire interphasique est sous forme d'euchromatine, soit une faible compaction de type « collier de perles », et d'hétérochromatine plus compacte, principalement sous forme de fibres de 30 nm, localement surenroulées en fibres de 300 nm. Les chromosomes métaphasiques sont entièrement compacts, sous forme de bras de 700 nm de larges, autour de protéines « d'échafaudages ». Iconographie d'après *Chromatin Structures*, Richard Wheeler, Wikimedia Commons CC BY-SA 3.0.

1.2.2.3 Chromatine et histones et régulation des transcrits

La chromatine est composée d'unités répétées de nucléosomes ; un nucléosome est constitué de 146 paires de bases d'ADN enroulé autour d'un octamère de 4 noyaux de protéines histones (H3, H4, H2A et H2B) [69], on parle alors d'histones conventionnels. Chez les mammifères, il existe d'autres variants d'histones, qui sont également impliqués dans des processus biologiques et peuvent être altérés dans des pathologies [70]. Enfin, les histones conventionnelles peuvent être modifiées, et ces modifications peuvent jouer un rôle en faveur ou en défaveur de la transcription, et sont associés à différentes fonctions biologiques [65].

Les marques épigénétiques (modifications des bases de l'ADN et des queues d'histones) sont mises en places par des enzymes, que les anglophones désignent *epigenetic writers*, sont interprétées par des protéines (*epigenetic readers*) et peuvent être enlevées par de nouvelles enzymes (*epigenetic erasers*) (**Tableau 5**). Par définitions, ces marques épigénétiques doivent être transmissibles lors de la mitose ; c'est notamment le cas de la méthylation de l'ADN.

| Marque épigénétique | Fonctions principales | exemples de writers | exemples d'erasers | exemples de writers |
|-------------------------------------|---|-----------------------|--------------------|-----------------------------|
| Méthylation des histones | | | | |
| H3K4me1/me2/me3 | Activation transcriptionnelle | SET11, MLL1-5 | LSD1, JARID | JMJD2, ING2, TFIID |
| H3K9me1/me2 | Inhibition transcriptionnelle | G9A, KMT1C | JHDM2, LSD1, PHF2 | |
| H3K9me3 | Inhibition transcriptionnelle, hétérochromatinisation | SUV39H1, ESET, SETDB1 | JMJD2 | HP1, MECP2, UHRF1, G9a, CDY |
| H3K27me1/me2/me3 | Inhibition transcriptionnelle | AZH1-2 | JMJD3, UTX | CDY, PC, CBX7 |
| H3K36me | Activation transcriptionnelle | HYBP | | |
| H3K79me1/me2/me3 | Activation transcriptionnelle | DOT1 | | 53BP1 |
| H3R2me2 | Inhibition transcriptionnelle | PRMT6 | JMJD6, PADI4 | TDRD3 |
| H4K20me1/me2/me3 | Inhibition transcriptionnelle, réparation de l'ADN | SUV4-20H1-2 | | PHF20, LRWD1 |
| Acétylation des histones | | | | |
| H2AK5ac | Activation transcriptionnelle, réparation de l'ADN | P300, CBP, HAT1 | HDACs | |
| H3K14ac | Activation transcriptionnelle, réparation et réplication de l'ADN | GCN5, P300 | HDACs | DPF3B |
| H4K5ac | Activation transcriptionnelle, réparation et réplication de l'ADN | ATF2, P300, HAT1 | HDACs | BRDT |
| H4K8ac | Activation transcriptionnelle, réparation et réplication de l'ADN | PCAF, TIP60, TAF1 | HDACs | BRDT |
| H4K16ac | Activation transcriptionnelle, réparation de l'ADN | MOF, TIP60 | HDACs | GCN5 |
| Phosphorylation des histones | | | | |
| H3S10P | Activation transcriptionnelle | MSK1, AURKB | | GCN5 |
| H2AXP | Réparation de l'ADN | ATM, ATR | PP2A | MDC1, BRCA1 |
| Ubiquitination des histones | | | | |
| H2AK119Ub | Activation transcriptionnelle, réparation de l'ADN | RING1B | | |
| H2BK120Ub | Activation transcriptionnelle, réparation de l'ADN | RNF20 | | WDR82 |
| Méthylation de l'ADN | | | | |
| 5mC | Inhibition transcriptionnelle | DNMT1, DNMT3A, DNMT3B | TET1-3 | MBD1,2,4, MECP2, KAISO |

Tableau 5 : Principales modifications épigénétiques des queues d’histones et de l’ADN et fonctions biologiques associées. D’après [344], [345] et [346].

1.2.3 Les ARN non codants

Parmi les mécanismes épigénétiques récemment caractérisés pour leur importance dans les cancers, les ARN non codant suscitent l’engouement d’un grand nombre de chercheurs. Ces ARN, transcrits à partir d’ADN ne sont pas traduits. La plupart d’entre eux sont fonctionnels et impliqués dans la synthèse et la régulation d’autres ARN, comme les ARN messagers, ARN de transfert ou les ARN ribosomaux. Il existe deux catégories d’ARN non codants : les courts et les longs. Parmi les ARN non codant courts, les plus connus sont les microARN (miARN), les ARN interférants (ARNi) et les petits ARN nucléaires (snARN). Les miARN, des ARN d’environ 22 nucléotides régulent négativement l’expression de gènes cible ; en effet, l’appariement de ces séquences en 3’ de leur ARNm cible induit leur dégradation ou l’inhibition de leur traduction [71-73]. Les miARN sont exprimés de manière tissu-spécifique et contrôlent un grand nombre de processus cellulaires, dont la prolifération, l’apoptose et la différenciation. Les ARN non codants longs (plus de 200 nucléotides) sont également impliqués dans la régulation transcriptionnelle [74].

Les ARN non codants sont impliqués dans le développement (l’inactivation du chromosome X, l’empreinte parentale), le maintien de l’état de différenciation cellulaire, et plus récemment, l’implication d’un grand nombre de ces séquences ont été démontrées dans la tumorigénèse, et particulièrement la dissémination métastatique [72, 74-76, 73].

1.2.4 La méthylation de l'ADN.

1.2.4.1 Structure de la 5-methylCytosine et impact sur la conformation de l'ADN

Les quatre bases de l'ADN, peuvent naturellement subir des modifications chimiques, ce qui peut leur conférer des propriétés particulières. La plus courante chez les mammifères correspond à la méthylation symétrique (sur chacun des deux brins) du carbone 5 des cytosines contenues dans le dinucléotide 5'-Cytidine -Guanosine-3' (abrégé en CpG) ; on parle alors de méthylcytosine (5mC), et c'est cette modification que l'on résume généralement par le terme méthylation de l'ADN.

La 5mC fut observée pour la première fois en 1948 par chromatographie sur papier d'hydrolysat d'acides nucléiques de thymus de veau [77]. Cette méthylation de l'ADN est une marque physiologique, synthétisée à l'aide d'enzymes et de cofacteurs, et dont la présence ou l'absence à un site donné est finement régulée.

La présence du groupement méthyle ne modifie pas la structure de la double hélice d'ADN, ni l'appariement avec la guanidine. Elle change cependant la forme ainsi que la surface électrostatique du petit, mais surtout du grand sillon de la double hélice d'ADN, empêchant ainsi l'éventuelle fixation de facteurs de transcription et favorisant le recrutement d'autres protéines de liaison à l'ADN.

La conformation de l'ADN est généralement en double hélice B (double hélice droite.), contrairement à la double hélice Z qui ne serait observable *in vivo* que de manière transitoire et locale (et qui correspond à une double hélice gauche). Dans ce contexte, la méthylation de l'ADN semble diminuer la stabilité des hélices B, et de favoriser ainsi la conformation hélice Z [78].

La 5mC peut subir désamination spontanée (environ deux cytosines méthylées sur 100 000 tous les ans) [79], ou bien enzymatiquement [80]. Cette désamination aboutit à une thymine, et induit donc un mésappariement T-G qui doit être réparé, soit en C-G (on obtient alors simplement une perte du groupement 5-méthyl), soit en T-A qui serait mutagène. La 5mC peut

être hydroxylée en 5-hydroxyméthylcytosine (hydroxyméthylcytosine, 5hmC, ou hmC) via une réaction enzymatique.

1.2.4.2 Synthèse

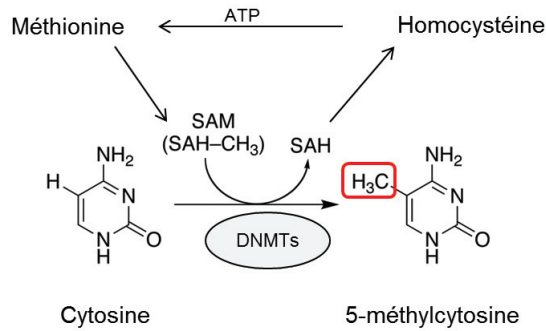
1.2.4.2.1 Mécanisme réactionnel

La réaction de méthylation de l'ADN est catalysée par des enzymes, les méthyltransférases d'ADN (DNMT1 et DNMT3A/B chez les mammifères). Cette réaction requiert la présence d'un cofacteur donneur de groupement méthyle : la S-adénosylméthionine (SAM), et induit le relargage d'une S-adenosyl-L-homocystéine (SAH), impliqué dans la synthèse d'homocystéine. Le cofacteur SAM est synthétisé à partir d'une méthionine en présence d'ATP à l'aide de méthionine adénosyl-transférase, et intervient dans d'autres réactions de méthylations, dont les méthylations d'histones.

1.2.4.2.2 Les enzymes responsables de la méthylation de l'ADN

Chez l'homme, la réaction de méthylation des cytosines est conduite par les ADN méthyltransférases (DNMTs), qui catalysent le transfert du groupement -méthyl de la SAM vers la cytosine. Ces dernières appartiennent à une famille protéique composée de cinq membres paralogues : DNMT1, TRDMT1 (anciennement appelée DNMT2), DNMT3A, DNMT3B et DNMT3L. Parmi ces membres, seules les protéines DNMT1 (maintenance), DNMT3A et DNMT3B (méthylation *de novo*) peuvent méthyler les cytosines en C5 au niveau des CpG ; ces protéines ont également des fonctions non catalytiques (**Figure 11**).

A



B

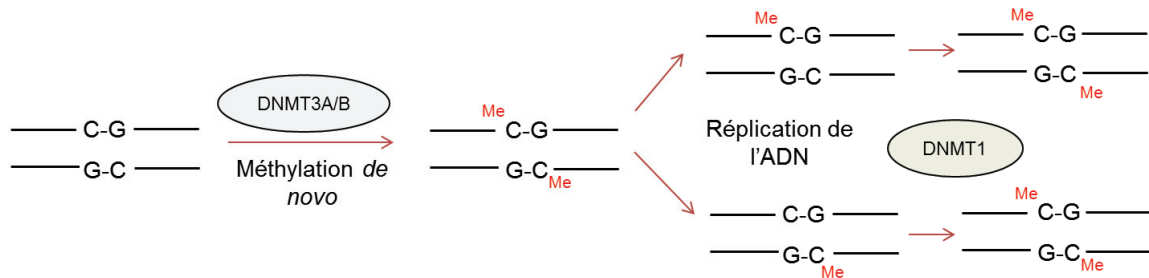


Figure 11 : Mécanismes de méthylation *de novo* et de maintenance par les DNMTs. (A). Méthylation d'une cytosine par les méthyltransférases d'ADN (DNMTs). A. La méthylation de l'ADN résulte du transfert d'un groupement méthyl à partir d'un cofacteur la S-adenosyl-L-méthionine, (SAM) qui devient une S-adenosyl-L-homocystéine (SAH). Cette réaction est effectuée sur les cytosines des dinucléotides CpG, et les enzymes catalysant cette réaction sont les DNMTs. (B). Les CpG héli-méthylés sont également cible de DNMT3A de maintenance (principalement DNMT1). Cette réaction explique la persistance de la méthylation des CpG Au cours des divisions cellulaires.

Lors de la réaction de méthylation, la cytosine cible est insérée dans le site catalytique de la DNMT, ou elle est extraite de l'intérieur de la double hélice, on parle alors de « flip out » [81-83]. Comme de nombreuses autres protéines, elles sont soumises à des modifications post-traductionnelles pouvant changer leurs fonctions biologiques. DNMT1 fonctionne comme une méthyltransférase d'ARN [84], tandis que DNMT3L stimule la méthylation *de novo* de l'ADN par la DNMT3A et interagit avec l'histone désacétylase1 (HDAC1) pour réprimer la transcription [85-87]. Il est intéressant de noter que la plupart des modèles de souris KO pour les protéines DNMT sont létaux, à l'exception de *Dnmt3l* ^{-/-}, pour lequel les souris présentent des anomalies d'empreintes parentales d'origine maternelle (**Figure 12**).

Phénotypes des souris DNMT ^{-/-}

| méthyltransférase | fonction | Phénotypes des mutants |
|-----------------------|---|--|
| <i>Dnmt1</i> | Méthylation de maintenance (principalement) | Létale, perte d'empreinte, expression de gènes liés à X inactif, cellules ES viables |
| <i>Dnmt0</i> | Isoforme ovocyte-spécifique | Perte d'empreinte |
| <i>Dnmt2</i> | Méthylation des sites non CpG chez la Drosophile | Pas de phénotype |
| <i>Dnmt3a, Dnmt3b</i> | Méthyltransférase de novo, mise en place de profils de méthylation (principalement) | Létale, syndrome d'ICF |
| <i>Dnmt3L</i> | Pas d'activité catalytique, colocalise avec <i>Dnmt3 a/b</i> | Empreinte maternelle anormale |

Figure 12 : phénotypes des souris *Dnmt* ^{-/-}.

1.2.4.3 Déméthylation de l'ADN

1.2.4.3.1 Passive

Lorsque l'enzyme DNMT1 n'assure pas le maintien de la méthylation sur les deux brins d'ADN, les cellules vont subir une déméthylation passive par dilution du motif après réplication (**Figure**

13). Bien que le maintien des motifs méthylés soit assuré par DNMT1, la présence de DNMT3A et 3B est également nécessaire au fonctionnement de ce système [88].

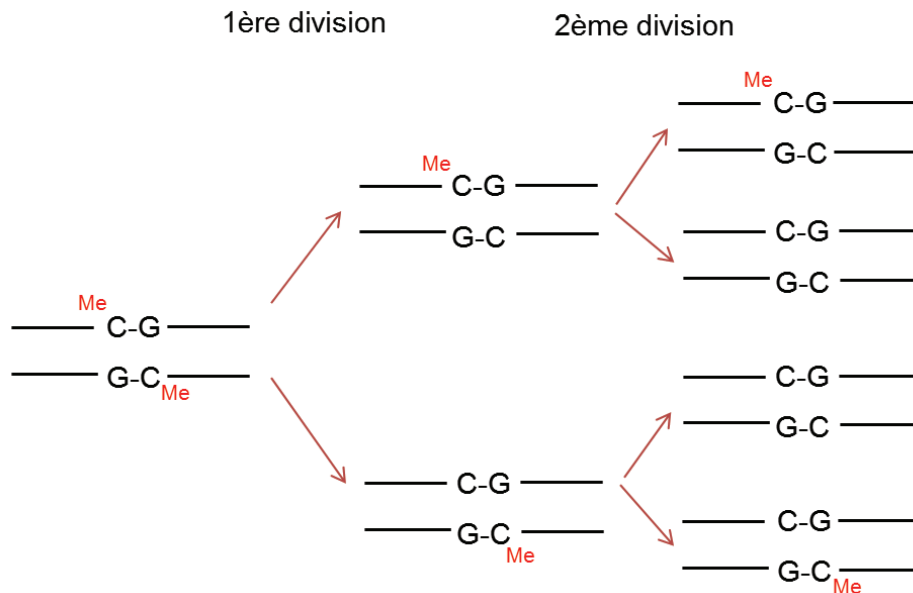


Figure 13 : Principe de la déméthylation passive.

1.2.4.3.2 Active

1.2.4.3.2.1 Via le mécanisme d'excision / réparation

Lorsqu'un fragment de l'ADN subit une réparation (en particulier lors des processus de BER/NER), la cytosine qui va être resynthétisée ne sera pas méthylée. Si cette dernière n'est pas prise en charge par les DNMTs, elle restera déméthylée. Ce phénomène pourrait être impliqué dans la déméthylation des cellules quiescentes ou à faible taux de division, comme les neurones ou les cellules musculaires.

1.2.4.3.2.2 Par l'intermédiaire de la 5-hydroxyméthylcytosine

Une 5mC peut subir une hydroxylation par l'intermédiaire d'enzymes de la famille TET (Ten Eleven Translocation methylcytosine dioxygenase), et ainsi être transformée en 5-hydroxyméthylcytosine. Chez l'homme, il existe trois membres de cette famille (TET1-3), tous

capables de métaboliser la 5hmC en 5-formylcytosine (5fC) puis en 5-carboxycytosine (5caC). Les produits formés sont ensuite détectés et réparés, pour reformer une cytosine non méthylée. Tandis que la méthylation de l'ADN serait plutôt une marque répressive sur la transcription, l'hydroxyméthylation de l'ADN serait une marque plutôt neutre ou activatrice [89, 90, 87]. Bien que l'importance et la fréquence de ce phénomène soit encore peu connus, un nombre croissant de publications démontrent un rôle de ce système dans divers phénomènes cellulaires, tels que la différenciation des cellules souches par des modifications des marques d'histones [91, 92].

1.2.4.4 Fonctions de la méthylation de l'ADN

1.2.4.4.1 Distribution dans le génome

Afin de mieux comprendre le rôle de la méthylation de l'ADN dans la régulation de l'expression génique, nous nous devons de nous pencher sur sa distribution au sein du génome. De manière globale, le génome est peu riche en CpG (28 millions), mais ces séquences sont méthylées dans 60 à 80% des cas chez l'adulte. L'hypothèse formulée serait que durant l'évolution, la désamination spontanée des cytosines contenues dans les CpG, associée à une mauvaise réparation, aurait induit une perte de méthylation au cours du temps [93, 94].

La distribution des CpG n'est pas uniforme au sein du génome ; 10% des CpG sont localisés soit au niveau de séquences répétitives riches en GC (séquences d'ADN ribosomiaux et satellites), soit dans des regroupements de CpG appelés îlots CpG [95]. Bien qu'il existe plusieurs définitions, la plus communément admise est qu'un îlot CpG correspond à une zone d'au moins 200 paires de bases présentant un taux $\text{CpG observés} / \text{CpG théoriques} > 0,6$ [96].

Chez l'homme, on dénombre près de 28 000 îlots CpG, généralement peu méthylés et dispersés dans le génome, dont 20 000 sont associés à un gène [97]. Ainsi, près de 60% des promoteurs de gènes (dont la plupart sont ubiquitaires) comportent des séquences riches en CpG [98, 99], ce qui suggère que ces derniers jouent un rôle dans la régulation transcriptionnelle. Ces îlots rarement méthylés et proches de promoteurs de gènes sont généralement enrichis en H3K4 me3, une marque histone favorisant entre autres le recrutement de TFIID, un facteur du complexe de pré-initiation de la transcription.

1.2.4.4.2 La méthylation de l'ADN, une marque répressive

La méthylation des CpG constitue une marque répressive de transcription ; cela signifie que lorsqu'un îlot CpG est méthylé, le gène qu'il borde n'est peu ou pas exprimé [100]. Chez les mammifères, un certain nombre de phénomènes indépendants semblent résulter de variations de méthylation de l'ADN [101]. (i) Tout d'abord, celle-ci permet le contrôle de l'inactivation du chromosome X, ainsi que de l'expression des gènes de l'empreinte parentale, qui constituent des régulateurs clés du développement. (ii) La méthylation des CpG est responsable de la répression de séquences répétées, et prévient de la relocalisation d'éléments transposables, ce qui favorise le maintien de la stabilité génomique [61]. (iii) La méthylation des CpG au niveau du corps de gènes transcriptionnellement actifs pourrait représenter une marque intervenant dans l'épissage alternatif [102-104]. Enfin, la méthylation réprime l'activité promotrice des gènes. Ces résultats sont également compatibles avec le modèle selon lequel la méthylation permet de réprimer certains gènes clés de manière permanente pour stabiliser les identités cellulaires.

Dans certains cancers, on peut observer des îlots CpG méthylés au niveau des promoteurs de groupes de gènes; on parle alors de phénotype méthylateur des îlots CpG (CIMP) [105, 106], [107]. Il est désormais communément admis que l'hyperméthylation des îlots CpG au niveau des promoteurs de gènes joue un rôle essentiel dans la perte d'expression d'un certain nombre de gènes associés au cancer, affectant alors une grande variété de processus cellulaires. Ainsi, les tumeurs ayant des marques CIMP représentent un sous-type de cancers présentant des hyperméthylations simultanées de plusieurs îlots CpG [108-110]. Enfin, il a été montré que ces zones hyperméthylées sont fréquemment bordées par de larges zones hypométhylées, et colocalisent avec la lamina nucléaire [111, 112].

1.2.4.4.2.1 Méthylation du corps des gènes et éléments répétés

La méthylation des corps de gène est associée à une activité transcriptionnelle, notamment au niveau des gènes actifs du chromosome X [113, 114], mais également dans le cerveau humain [115, 116]. La simple présence d'ADN méthylé n'est donc pas forcément associée à une répression transcriptionnelle, mais nécessite d'être interprétée selon le contexte génomique et cellulaire.

Les rôles principaux de la méthylation du corps des gènes en dehors des îlots CpG sont les suivants :

- La répression transcriptionnelle des éléments répétés, telle que les rétrovirus, les séquences LINE et Alu entre autres. La méthylation, dans ce contexte, bloque l'initiation de la transcription des éléments répétés, tout en permettant l'expression des gènes de l'hôte [117].
- Elle favoriserait le processus d'épissage alternatif [118-120].

Méthylation et enhancer/ insulateurs: les enhancers sont situés à des distances variables du promoteur, et représentent des sites clés pour la régulation de l'expression génique. Pour la plupart, les enhancers sont pauvres en CpG méthylés. Bien que le rôle de la méthylation dans la régulation transcriptionnelle liée aux enhancers reste peu étudié, il semblerait qu'elle permette de réduire l'activité des enhancers [66]. Quant aux insulateurs, ces éléments capables de bloquer l'interaction entre un promoteur et un enhancer (comme CTCF), il semblerait que la méthylation de l'ADN puisse bloquer l'interaction de ces protéines avec l'ADN, inhibant ainsi sa fonction [121], ou favorisant l'épissage alternatif [122].

1.2.4.4.2 Méthylation du promoteur et répression des gènes

La méthylation de CpG hors îlot CpG peut également être associée à une répression transcriptionnelle dans les cellules de mammifères ; c'est le cas par exemple des gènes Masp1, et de ceux de la famille MAGE, dont le promoteur est certes riche en CpG, mais pas suffisamment pour être introduit dans la catégorie d'îlot CpG [123], [98]. Si l'on considère à l'échelle chromosomique l'ensemble des gènes différentiellement méthylés selon les tissus, on constate, qu'environ 1/3 d'entre eux montrent une corrélation négative avec l'expression génique [124]. Le lien de causalité entre méthylation de l'ADN et répression transcriptionnelle a été testé de différentes manières :

- Par méthylation *in vitro* d'un plasmide suivi de la mesure du gène rapporteur associé, et comparé au même plasmide non méthylé [100].
- Par traitement à l'aide d'inhibiteurs de DNMT (5-aza-2-désoxycytidine et 5-azacytidine), suivi de tests d'expression de gènes initialement méthylés. Ces deux drogues correspondent à des analogues de nucléosides capables de se lier de manière covalente aux DNMT qui se retrouvent alors piégées. Ainsi, le génome subit une dilution de la méthylation par réplication en absence de maintenance des motifs

méthylés dans les cellules prolifératives[125], ainsi que la réexpression de gènes éteints avant traitement.

- Les KO pour DNMT1 ont un phénotype létal, mais dans les cellules ES, cette perte d'expression induit la perte de certaines empreintes parentales, ainsi qu'une activation du chromosome X.

Néanmoins, l'activité polymérase II n'est pas diminuée *in vitro* en présence de méthylation [126, 127]; cela suggère que la méthylation n'est pas suffisante d'elle-même à réprimer les gènes, mais représenterait plutôt une marque épigénétique nécessitant d'être interprétée pour induire un effet physiologique [128].

Les effets répressifs de la méthylation de l'ADN sur l'expression de gènes et d'éléments répétés impliquent deux mécanismes majeurs [129].

- la perte d'affinité des facteurs de transcription à l'ADN lorsqu'il est méthylé ; c'est le cas entre autres des facteurs de transcription CTCF [121], [130, 131] CREB [132], E2F1 [133], c-Myc [134] ... bien qu'un ensemble de résultats semble montrer que ce phénomène n'est pas le plus fréquent [61].
- L'implication de protéines permettant de faire le lien en terme de compaction de la chromatine et répression transcriptionnelle entre un CpG méthylé et le recrutement de complexes répresseurs associés à la chromatine. Ces protéines sont regroupées sous le nom de Methyl-DNA-Binding Proteins, ou MBP.

1.2.4.5 Les MBP, ou le lien entre ADN méthylé, chromatine et régulation transcriptionnelle

La plupart des protéines capables de lier l'ADN méthylé sont regroupées en 3 classes structurelles : les protéines à « methyl-CpG Binding Domain (ou MBD), les protéines à doigt de zinc et les protéines « *Ubiquitin-like with PHD and ring finger domains* » (UHRF) [61], [101],[135] (**Figure 14**).

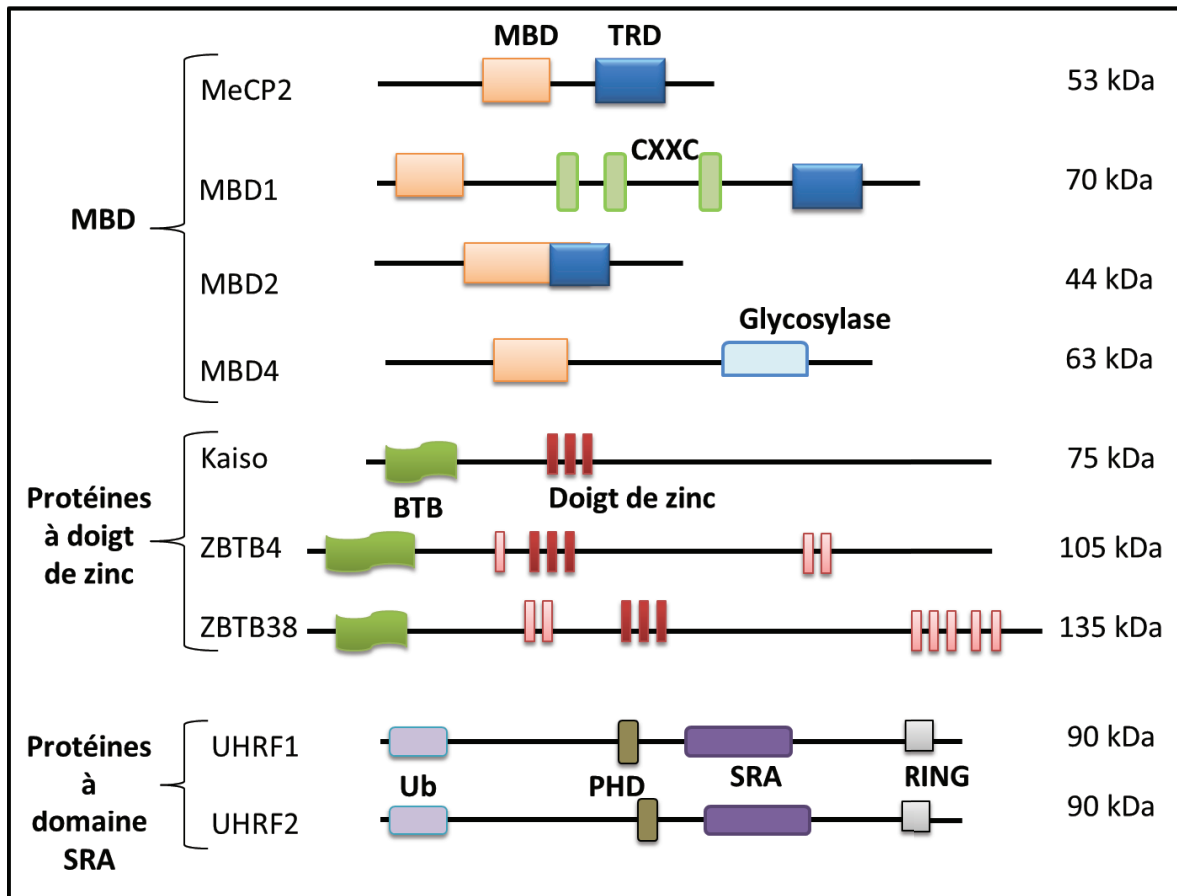


Figure 14 : les protéines MBP.

1.2.4.5.1 Les protéines MBP à domaine MBD

Découverte en 1992 par l'équipe d'Adrian Bird, MeCP2 fut la première protéine MBD à être caractérisée pour son affinité envers les 5mC [136]. Ses homologues MBD1, MBD2 et MBD4 furent ensuite découvertes ; l'ensemble de ces protéines interagissent avec l'ADN méthylé via leur domaine MBD [137].

Il existe d'autres membres de cette famille n'ayant pas d'affinité pour les méthylcytosines ; parmi eux, MBD3, MBD5 et MBD6 sont tout de même associées à des marques épigénétiques puisqu'elles colocalisent avec l'hétérochromatine, et interagissent avec des protéines du complexe Polycomb PR-DUB [138, 139].

A l'inverse, on retrouve un domaine MBD dans les protéines n'appartenant pas à cette famille ; c'est le cas des HMT SETDB1 et SETDB2 impliquées dans les modifications de la chromatine,

et des HAT BAZ2A et BAZ2B, impliquées dans des complexes de remodelage de la chromatine [140] (**Tableau 6**).

| Nom | Domaine | Fonction biologique principale | Autre fonction biologique | Liaison aux cytosines méthylées | Liaison aux cytosines non méthylées |
|--------------------|----------------------------|--|---------------------------|---------------------------------|-------------------------------------|
| Domaine MBD | | | | | |
| MeCP2 | MBD, TRD | Répression transcriptionnelle des promoteurs méthylés | | OUI | NON |
| MBD1 | MBD, CXXC1 à 3, TRD | | Réparation de l'ADN | OUI | OUI |
| MBD2 | MBD | | | OUI | NON |
| MBD3 | MBD | | | NON | OUI |
| MBD4 | MBD, Glycosylase | Répression transcriptionnelle via des modifications d'histones et de remodelage de la chromatine | | OUI | NON |
| MBD5 | MBD, PWWP | | | NON | OUI |
| MBD6 | MBD | | | NON | OUI |
| SETDB1 | MBD, TUDOR1/2, preSET, SET | | HMT | NON | OUI |
| SETDB2 | MBD, preSET et SET | | | NON | OUI |
| BAZ2A | MBD, DDT, PHD, BROMO | | HAT | NON | OUI |
| BAZ2B | MBD, DDT, PHD, BROMO | | | NON | OUI |

Tableau 6. Protéines à domaine MBD, liaison à l'ADN méthylé et fonctions associées. D'après [347].

1.2.4.5.2 Les protéines MBP à doigt de zinc

KAISO, le premier membre de la famille de MBP à doigts de zinc a été découvert par Egor Prokhortchouk, Adrian Bird et leurs collaborateurs, qui ont montré que le domaine à doigt de zinc permettait de discriminer les CpG méthylés des non méthylés [141]. Cette protéine peut également lier spécifiquement un motif consensus non méthylé, appelé site de liaison à KAISO (KAISO Binding Site ou KBS) [142]. Chez les mammifères, il existe deux paralogues proches de KAISO : les protéines ZBTB4 et ZBTB38, qui regroupent les mêmes caractéristiques que KAISO [143-145].

Une autre protéine à doigt de zinc a également été montrée capable de reconnaître et lier l'ADN méthylé et d'intervenir dans la maintenance des gènes liés à l'empreinte parentale [146].

1.2.4.5.3 Les protéines UHRF

Les protéines UHRF1 et 2 ont été caractérisées en 2004 par l'équipe de Yusuke Nakamura pour leur capacité de liaison à l'ADN méthylé via leur domaine SRA [135]. UHRF1 a ensuite été montré comme un facteur majeur impliqué dans la maintenance de la méthylation ; en effet, cette protéine est capable de lier particulièrement l'ADN hémiméthylé et d'y recruter DNMT1 afin de faciliter la maintenance. En son absence, une perte de méthylation est observée [147, 148]. Contrairement aux autres MBP, UHRF1 ne semble pas reconnaître de motif particulier de l'ADN à part les dinucléotides CpG hémiméthylés, ce qui renforce son implication dans la maintenance de la méthylation du génome entier.

De récentes études ont montré l'existence d'autres protéines pouvant elles aussi interagir avec de l'ADN contenant des CpG méthylés, notamment des protéines à homéobox ou ayant un domaine à hélice « ailée » (winged helix domain) [149], [91]. L'ensemble de ces protéines, MBP ou pas, sont impliquées dans la régulation transcriptionnelle.

Enfin, il est intéressant de noter que MECP2, KAI1, ZBTB4 et UHRF1 peuvent également interagir avec les hydroxyméthylcytosines 5hmC, soulevant ainsi le rôle potentiellement bivalent de ces protéines en termes de régulation de l'expression génique [91], [150, 151].

1.2.4.6 Méthylation de l'ADN et état de la chromatine

Les MBP représentent donc le lien clé entre méthylation de l'ADN et modifications des histones liées à la répression transcriptionnelle. Historiquement, la première MBP découverte pour ce type d'activité est MeCP2, qui lie préférentiellement l'ADN méthylé et recrute des complexes histone désacétylases (HDAC) et méthyltransférases (HMT) au niveau des CpG, ce qui induit une compaction de la chromatine et par conséquent la répression transcriptionnelle du gène ciblé [152-154] (**Figure 15**).

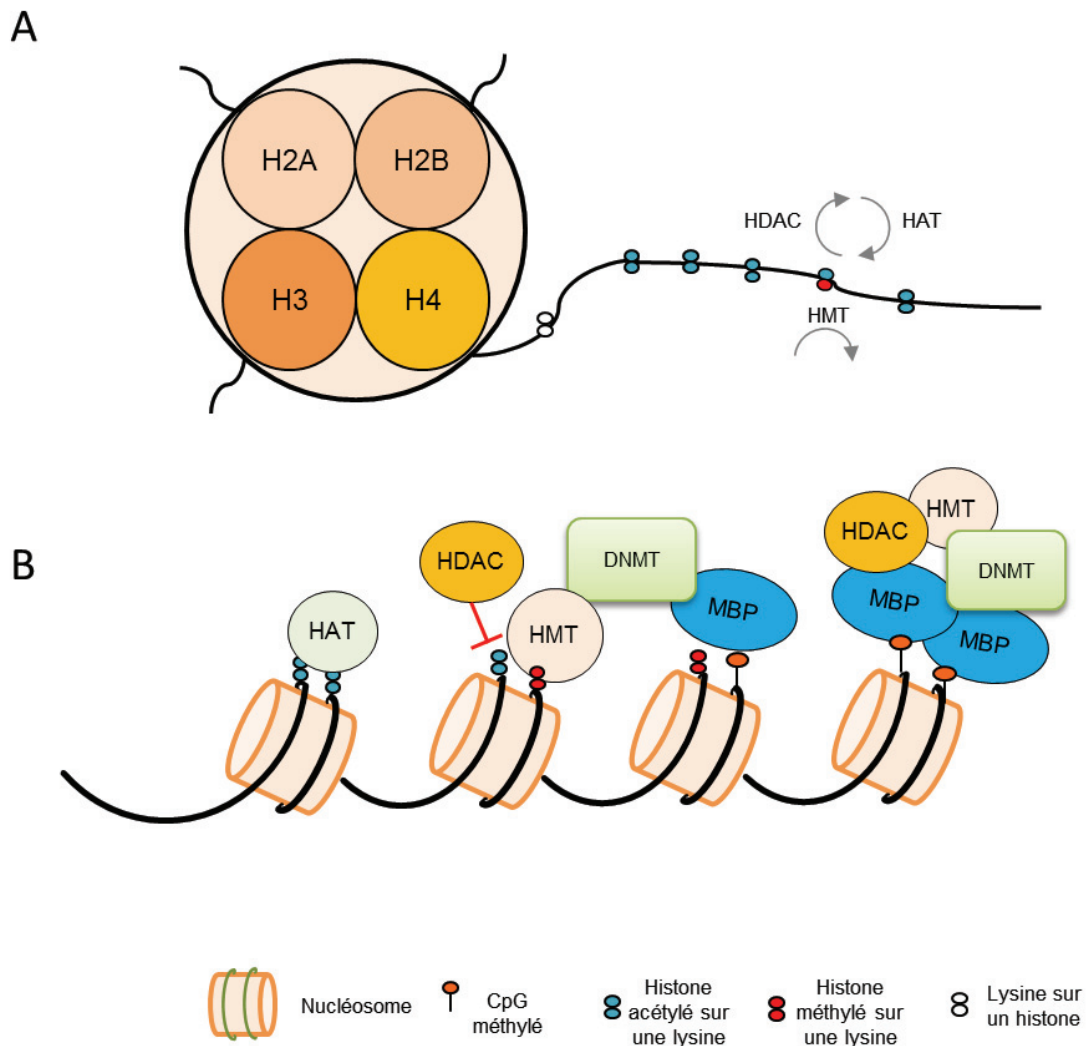


Figure 15 : organisation des nucléosomes et modifications de la chromatine liées à la méthylation de l'ADN.

- A. Les nucléosomes sont composés de 8 protéines histone organisées par paires : H2A, H2B, H3 et H4. Les queues d'histones dépassent de cette structure protéique, et les résidus lysine peuvent subir des modifications telles que l'acétylation (par des histones acétylases, ou HAT), ou la méthylation (catalysée par des histone méthyltransférases HMT).
- B. L'expression génique est associée à l'acétylation des lysines. Les histones désacétylases, qui permettent de supprimer l'acétylation des lysines, sont nécessaires pour méthyler ces mêmes lysines (marque répressive). L'ADN peut également être méthylyé par les DNMT au niveau de CpG. Cette marque participe à la formation de complexes multiprotéiques contenant des HDAC, HMT et MBP. D'après [348].

Le lien entre modifications covalentes des histones et repositionnement des nucléosomes semble également impliquer fréquemment la méthylation de l'ADN. Par exemple, il a été montré que MBD2 interagit avec le complexe de remodelage de la chromatine NuRD [155]. MeCP2 est également capable d'interagir avec le complexe de remodelage de la chromatine SWI/SNF [156].

D'autres études montrent également que les modifications covalentes des histones permettent de coupler ces phénomènes au remodelage de la chromatine par l'intermédiaire d'une machinerie de remodelage ATP dépendante [48], [157], [158].

L'ensemble de ces travaux suggèrent que les processus de méthylation des cytosines, de modification des histones et de repositionnement des nucléosomes sont intimement liés, et que les altérations de ces voies ont pour conséquence la perte d'expression durable de gènes impliqués dans les cancers (**Figure 16**).

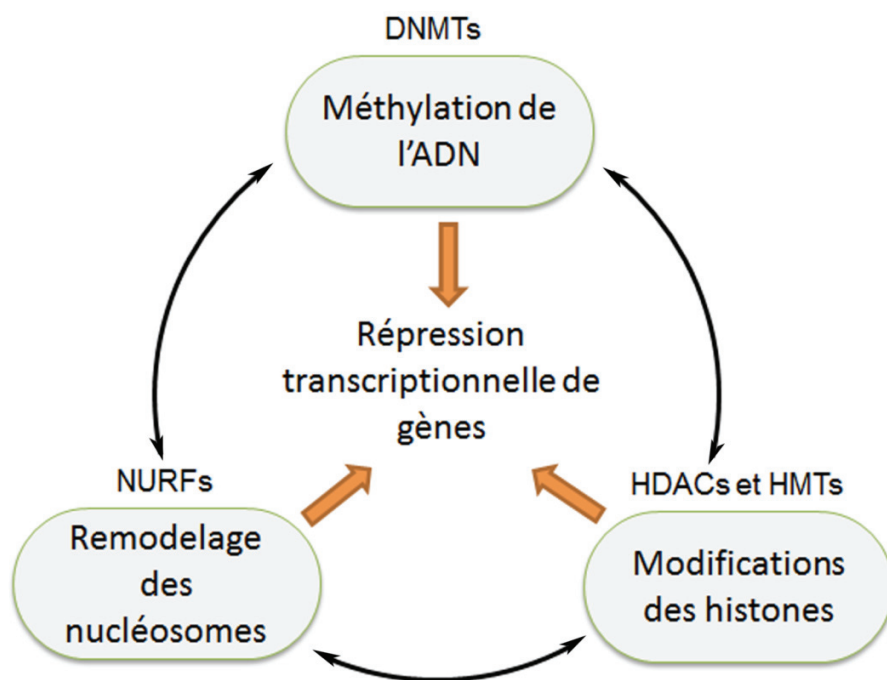


Figure 16 : jeu croisé entre les marques épigénétiques, et conséquences sur la répression transcriptionnelle dans les cellules normales. La perte d'expression héritable d'un gène implique entre autres l'interaction entre la méthylation de l'ADN, les modifications covalentes des histones ainsi que le remodelage des nucléosomes. Certaines enzymes contribuent à ce processus, comme les méthyltransférases d'ADN (DNMTs), les histones désacétylases (HATs) et méthyltransférases (HMTs), ainsi que le complexe de facteurs de remodelage des nucléosomes (NURFs). D'après [154].

1.2.4.7 Méthylation et réparation de l'ADN

Bien que ce phénomène demeure peu caractérisé, plusieurs indications tendent vers l'hypothèse d'un rôle de la méthylation de l'ADN dans la réparation, et permettrait de favoriser une re-méthylation de CpG réparés. Ainsi, DNMT1 a été montré comme pouvant être recruté au niveau des sites de réparations de l'ADN, et semble capable d'induire (avec DNMT3) une hyperméthylation de ces zones [159], [160].

1.2.5 Altérations épigénétiques dans les cancers

1.2.5.1 Notions générales d'épigénétique et cancer

Dans les cancers, on observe des motifs aberrants des différents effecteurs épigénétiques de manière concomitante avec les lésions génétiques: la méthylation de l'ADN, les modifications d'histones et les micro-ARN (miARN). Dans les cellules normales, l'interaction entre les facteurs épigénétiques et la structure de la chromatine conduit à une régulation fine de l'expression des gènes. Or, dans les cellules tumorales, les promoteurs de GST sont fréquemment hyperméthylés et associés à un paysage de modifications des histones globalement altéré, induisant une répression transcriptionnelle aberrante [161, 162]. De plus, l'hypométhylation globale de l'ADN induit une instabilité ainsi qu'une fragilité chromosomique des cellules tumorales, menant ainsi ces dernières vers une boucle d'oncogénèse.

Les changements épigénétiques, dont la méthylation de l'ADN et les modifications d'histones, sont également impliqués dans l'expression anormale d'ARN messagers (ARNm) et de miARN, induisant ainsi une activation aberrante d'oncogènes ainsi que la perte d'expression de GST (**Figure 17**) [163]. Pour résumer, un certain nombre de gènes impliqués dans la régulation épigénétique sont altérés dans les cancers, et ce phénomène est associé à la tumorigénèse ainsi qu'à la croissance et l'agressivité des tumeurs (**Figures 18 et 19**).

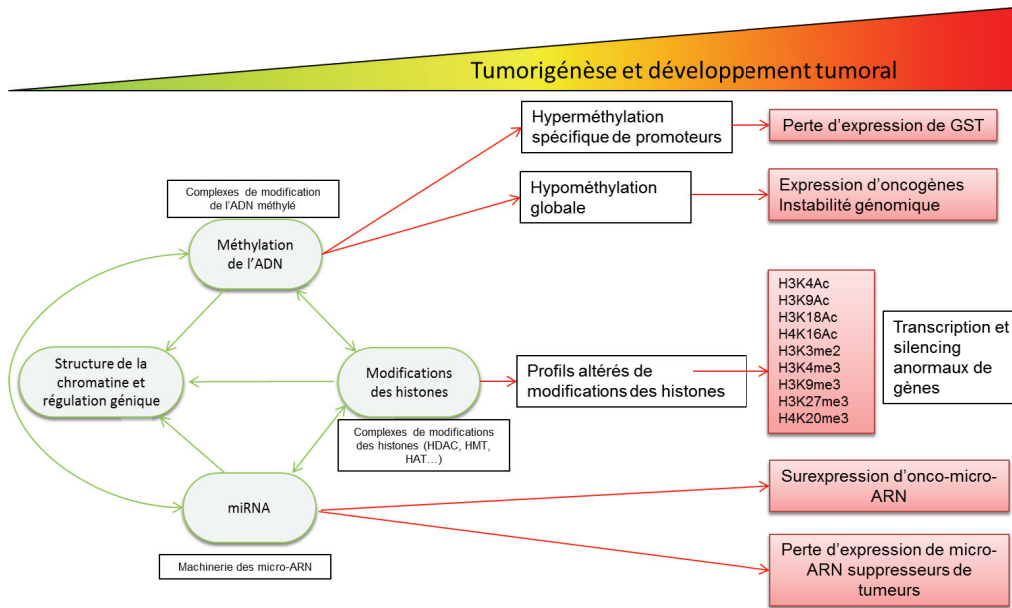


Figure 17 : Description générale des altérations épigénétiques observables durant l'oncogénèse. D'après [52].

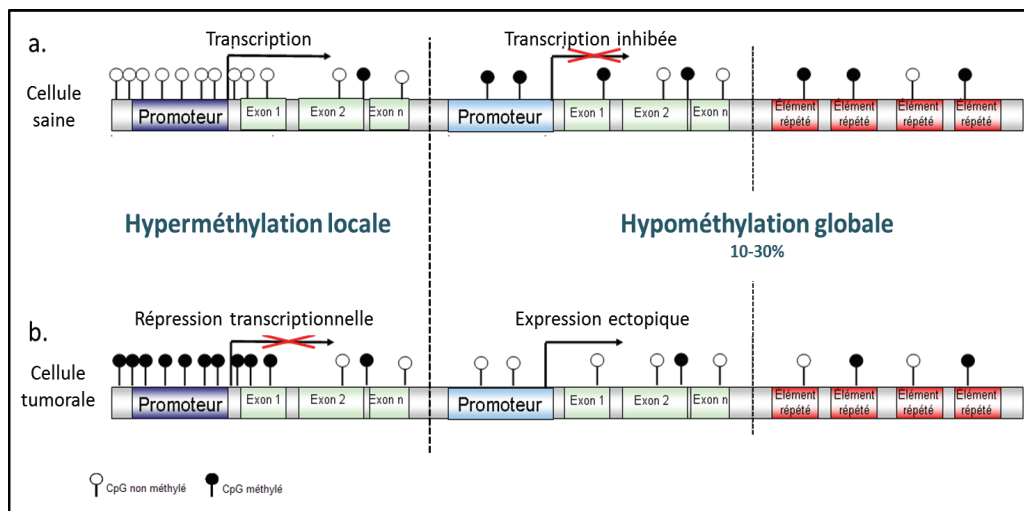


Figure 18: Altérations des profils de méthylation au cours de la cancérogenèse Comparaison des profils de méthylation de l'ADN de différentes régions entre une cellule normale et une cellule cancéreuse. a) Dans une cellule normale, les promoteurs riches en CpG sont non méthylés et associés à une activation transcriptionnelle alors que les promoteurs pauvres en CpG sont plutôt méthylés et associés à une répression transcriptionnelle. Les éléments répétés sont également les cibles d'une méthylation de l'ADN. b) Dans une cellule cancéreuse, une hyperméthylation locale de promoteurs riches en CpG est associée à une hypométhylation globale de 10 à 30% du génome. Ces deux phénomènes provoquent respectivement l'extinction ectopique de certains gènes (gènes suppresseurs de tumeurs) alors que d'autres gènes sont réactivés oncogènes. Les éléments répétés hypométhylés favorisent l'instabilité chromosomique.

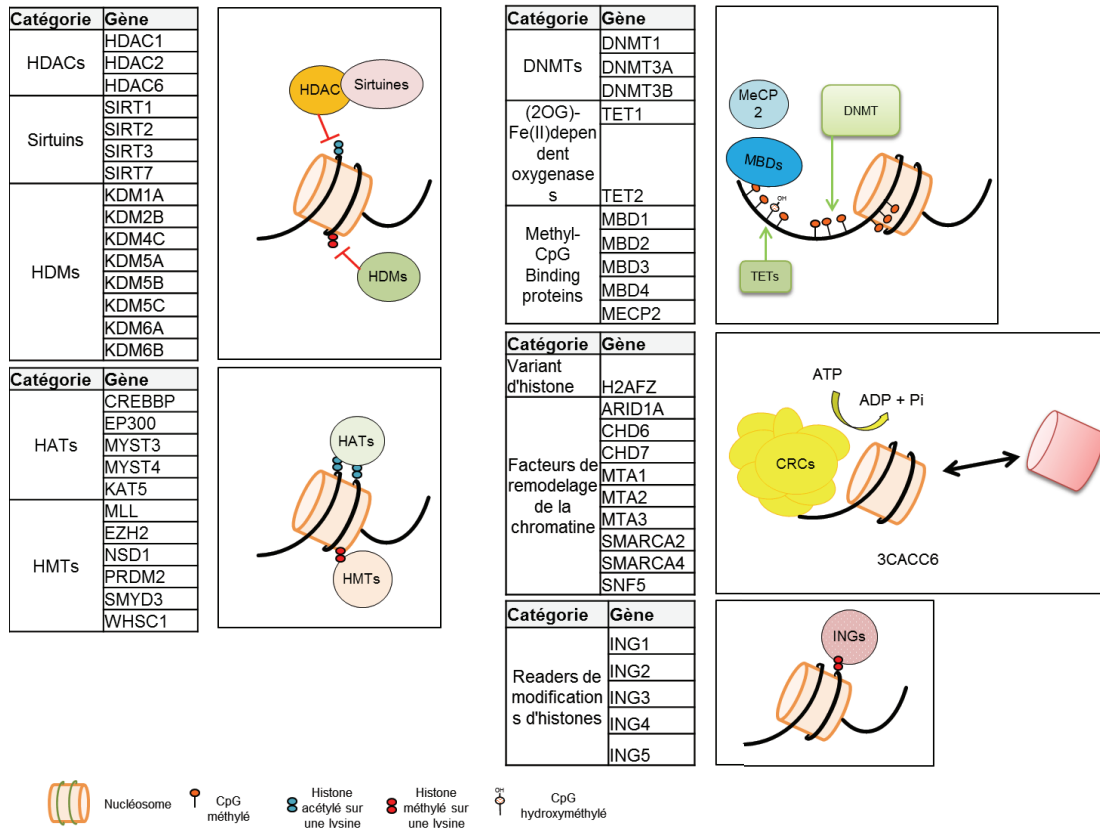


Figure 19 : Sélection de gènes intervenant dans la régulation épigénétique, et qui sont fréquemment altérés dans les cancers.

Parce qu'il est difficile d'énumérer l'ensemble des altérations caractérisées jusqu'à présent dans les cancers, je vais me permettre de me concentrer sur les deux types tumoraux qui ont fait l'objet de mon travail de thèse, c'est-à-dire les cancers du sein et du poumon.

Dans les cancers du sein et des poumons, les cellules tumorales subissent de très nombreuses altérations épigénétiques; en effet, une hypométhylation globale ainsi que l'hyperméthylation de nombreux gènes ont été observées [162], [164, 51] (**Tableau 7**). De plus, on observe dans les deux cancers des mutations de facteurs de remodelage de la chromatine tels que *BRG1*, mais également de *ARID1A*, *ARID1B*, *PBRM1* et *BAF60A* dans les tumeurs mammaires et des délétions de *CBP* (impliqué dans l'acétylation des histones) dans le cancer du poumon [165]. C'est la raison pour laquelle un certain nombre d'épi-thérapies ont vu le jour durant ces dernières décennies, dont certaines sont actuellement commercialisées en tant que chimiothérapie pour traiter des cancers.

| Gène | Fonction |
|-------------------------|--|
| SEIN | |
| CDH1 | adhésion cellule/cellule |
| BRCA1 | réparation de l'ADN, transcription |
| GSTP1 | conjugaison au glutathion |
| ER | récepteur aux oestrogènes |
| PR | récepteur à la progestérone |
| PRLR | récepteur aux prolactines |
| SYK | Tyrosine kinase |
| RIZ1 | méthyltransférase d'histones et protéines |
| TMS1 | pro-apoptotique |
| RARB | récepteur aux acides rétinoïques |
| POUMONS | |
| RARβ2 | récepteur aux acides rétinoïques-β2 |
| NORE1A | homologue des effecteurs Ras |
| WIF1 | facteur d'inhibition de la voie Wnt |
| SOCS3 | Inhibiteur de la voie JAK–STAT |
| DAPK | pro-apoptotique |
| IGFBP3 | protéine de liaison aux facteurs de croissance |
| MGMT | réparation de l'ADN |
| miR-200s | |
| APC | signalisation WNT |
| GSTP1 | Détoxification |
| SEINS ET POUMONS | |
| p16INK4a | inhibiteur de kinase cycline-dépendant |
| MGMT | réparation de l'ADN |
| LKB1/STK11 | Serine–threonine kinase |
| RASSF1A | homologue des effecteurs Ras |
| CDH1 | E cadherin, adhésion cellulaire |
| CDH13 | H cadherin, adhésion cellulaire |
| HIC1 | facteur de transcription |
| miR-148a | suppression des métastases |
| miR-34b | |
| miR-34c | |
| miR-9 | |
| PYCARD | Apoptose |
| SRBC | protéine de liaison à BRCA1 |

Tableau 7 : liste de gènes hyperméthylés dans les cancers du sein et du poumon. D'après [162] et [51].

1.2.5.2 Thérapeutiques épigénétiques

1.2.5.2.1 Introduction

Comme précédemment décrit, la propriété principale des épi-mutations est qu'elles sont réversibles. Ainsi, une grande attention a été portée ces dernières années sur la recherche d'épidrogues, qui par l'inhibition d'enzymes des différentes machineries épigénétiques, pourraient restaurer un paysage épigénétique sain dans les cellules cancéreuses [51], [166, 167] (**Figure 20**).

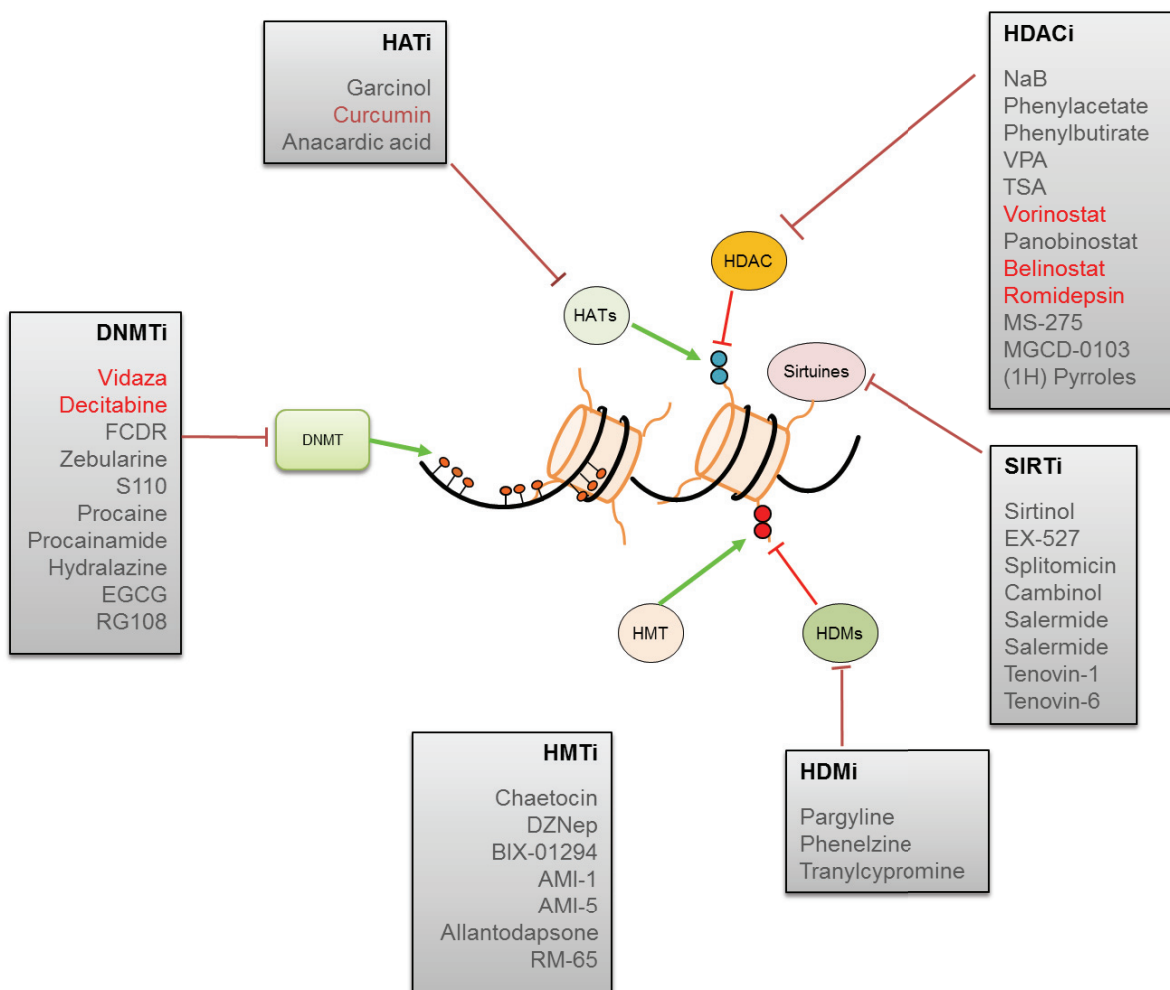


Figure 20 : Drogues épigénétiques développées pour la thérapie anticancer. Un certain nombre de composés ont été montrés efficaces contre les cellules cancéreuses via l'inhibition de composants de leurs machineries épigénétiques. Cette figure représente les principales épidroges classées selon leur cible épigénétique. Les molécules commercialisées en tant qu'agent anticancer sont indiquées en rouge.

A l'heure actuelle, cinq de ces composés ont reçu une autorisation de mise sur le marché (AMM) aux Etats-Unis et/ou en Europe. Les deux inhibiteurs de DNMT Vidaza et Décitabine (5-aza et 5-aza-2'-deoxycytidine, respectivement), sont en effet délivrés à des patients atteints de syndromes myéloдисplasiques disposant de peu d'options thérapeutiques, et développant une leucémie aigüe. Quant aux trois inhibiteurs de HDAC, Vorinostat, romidepsin et belinostat (acide subérylanilide hydroxamique (SAHA), FK-228, PXD101, respectivement), ils sont utilisés aux Etats Unis pour traiter différents types de lymphomes et de cancer hématologiques [168-176]. En plus de ces molécules, des inhibiteurs de HDAC de classes I, II et IV, ainsi que des inhibiteurs de sirtuines (HDAC de classe III), HAT, HDMs, HMTs, ont été activement recherchés.

1.2.5.2.2 Les inhibiteurs d'HDAC

1.2.5.2.2.1 Les HDAC, photo de classe

La première étude suggérant que l'acétylation aberrante des histones à l'échelle du génome a été effectuée en 2005 par l'équipe de Manel Esteller, et montre une perte globale d'histones H4 monoacétylés et/ ou tri-méthylés dans des cellules cancéreuses [177]. Un certain nombre d'études de corrélation ont démontrées l'expression anormale des HDAC dans les tumeurs humaines, et l'expression des HDAC1, 5 et 7 peut même être utilisée en tant que biomarqueur moléculaire spécifiquement tumoral [163], [178].

Il existe plusieurs classes de HDAC :

- Classe 1 : regroupe les HDAC1 à 3 ainsi que HDAC8. Ces protéines sont surexprimées dans différents cancers dont les cancers gastriques, mammaires, colorectaux, les lymphomes hodgkinien (HL), poumons..., et peuvent être diminuées comme c'est le cas de l'HDAC8 dans le cancer du foie.
- Classe 2a : leur profil d'expression est spécifique des tissus ; cette classe regroupe les HDAC4, 5, 7 et 9. Dans les cancers, l'expression de ces protéines peut être augmentée (médulloblastomes, leucémies aigües) ou diminuée (poumon).
- Classe 2b : ces protéines ont un profil d'expression tissu-spécifique. Cette classe comprend l'HDAC6, surexprimée dans les cancers mammaires et diminuée dans les cancers des poumons, et l'HDAC10.

- Classe 3: protéines de la famille SIRT (sirtuines); ces protéines (SIRT1 à 7) ciblent particulièrement les histones acétylés, qui montrent des profils anormaux dans de nombreux cancers. Elles sont particulièrement impliquées dans le maintien de l'intégrité génomique.
- Classe 4: HDAC11 est une protéine dont le profil d'expression est tissu-spécifique, et qui est surexprimée dans les cancers du sein, des reins et du foie.

Les HDAC étant impliqués principalement dans la régulation génique, les inhibiteurs de HDAC (HDACis) peuvent induire l'apoptose [179-181], l'arrêt de croissance, la sénescence, la différenciation [182, 183], l'immunogénicité des cellules tumorales, et peuvent également inhiber l'angiogénèse [184]. Il est donc difficile d'imaginer que l'effet thérapeutique lié à l'utilisation de l'un d'entre eux puisse résulter d'un seul processus cellulaire. Les effets biologiques et thérapeutiques dépendent très probablement des lésions génétiques inhérentes à chaque tumeur, ainsi que du contexte épigénétique [163].

1.2.5.2.2.2 Les inhibiteurs de HDAC

Généralement, les inhibiteurs de HDAC contiennent un domaine de liaison à un métal, qui peut bloquer la chélation du zinc au niveau des sites actifs des HDAC. Ils sont classés en quatre classes distinctes: les acides gras à chaîne courtes, des acides hydroxamiques, des peptides cycliques et des dérivés de benzamide. Les sirtuines, qui en revanche ont besoin de NAD⁺ au niveau de leur site actif, ne sont pas touchées par ces inhibiteurs, et ont donc des molécules dédiées [185-187]. Les principales molécules développées sont représentées Figure 17.

1.2.5.2.2.2.1 Acides gras à chaîne courtes

Comprennent le NaB, le valproate et le phénylbutyrate et phénylbutyrate. Les butyrates, comme le NaB, permettent l'inhibition de la prolifération cellulaire dans les carcinomes du colon, colorectaux, de la prostate, de l'endomètre et du cervix à de fortes concentrations [188, 189].

Le valproate semble impliqué de manière plus ou moins efficace dans la différenciation cellulaire de cellules de carcinome, et dans des types cellulaires transformés de leucémies myéloïdes aigues [190].

1.2.5.2.2.2.2 Acides hydroxamiques

Ils comprennent la trichostatine A, le vorinostat, le panobinostat et le bélinostat. Les vorinostat (SAHA) et le bélinostat sont tous deux commercialisés en tant qu'agent anticancer aux états unis [169], [191, 192]. Quant à la trichostatine A, bien que cette dernière ait montré une efficacité thérapeutique, elle induit trop d'effets indésirables pour être admise en thérapie. Enfin, le panobinostat est actuellement utilisé en combinaison phase I ou II un certain nombre de tumeurs variées.

1.2.5.2.2.2.3 Peptides cycliques

Cette classe comprend le romidepsin, utilisé en clinique pour les leucémies myéloïdes aigues (LAM) et chroniques (LCM) et pour les lymphomes cutanés à cellules T (CTCL) [168],[193, 194].

1.2.5.2.2.2.4 Dérivés de benzamide

Cette classe comprend le MS-275 (entinostat), actuellement en essais cliniques de phase I à III pour différents types de tumeurs solides et non solides.

1.2.5.2.3 Les inhibiteurs de DNMT1

Les inhibiteurs de DNMT comprennent des analogues de nucléosides ainsi que d'autres types de molécules. Parmi les analogues, on retrouve les deux épi-drogues disposant d'une autorisation de mise sur le marché : la décitabine ainsi que la vidaza (**Figure 21**), [195].

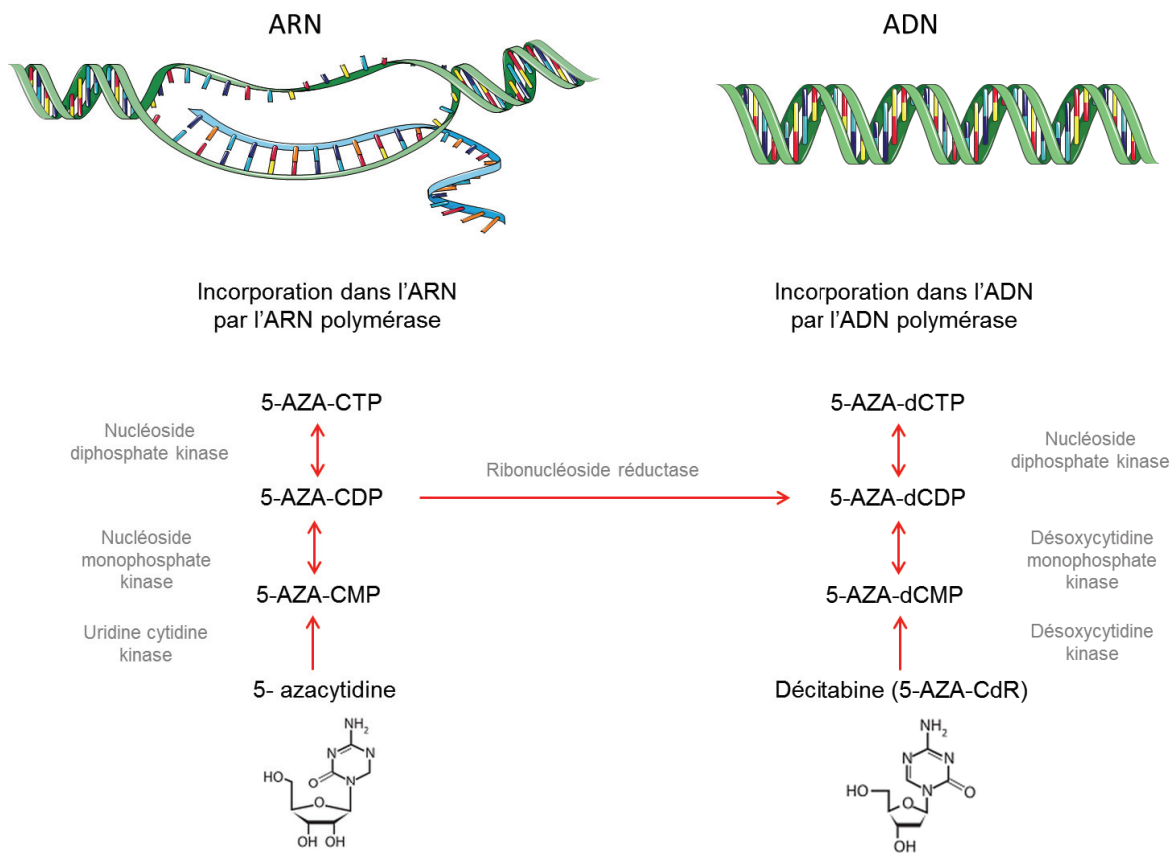


Figure 21 : Mécanismes d'activation des pro-médicaments décitabine et azacytidine.

1.2.5.2.3.1 Décitabine

La décitabine représente un pro-médicament, qui doit être phosphorylé en sa forme active de triphosphate (5-aza-dCTP). Ce phénomène est possible grâce aux actions successives de la désoxycytidine kinase, désoxycytidine mono-phosphate kinase et de nucléoside diphosphate kinase. La forme active 5-aza-dCTP est alors incorporée dans l'ADN durant la phase S des cellules en division. Une fois incorporée, la décitabine va piéger la DNMT1 via son atome d'azote en C5 de la base pyrimidine, induisant ainsi une hypométhylation de l'ADN de l'ADN néosynthétisé. L'hypométhylation résultante est responsable d'un ensemble de processus physiologiques, tels que la réactivation de gènes suppresseurs de tumeurs, la sénescence, la différenciation cellulaire ou l'apoptose dans les cellules cancéreuses. L'inhibition de la croissance cellulaire n'est détectée qu'au bout de 2 à 3 cycles de division cellulaire, et le

traitement à long terme permet d'induire une perte de la clonogénicité des cellules tumorales (Figure 18).

La dose ainsi que le temps d'exposition de la décitabine sur les cellules tumorales induisent différentes réponses cellulaires. En effet, une forte dose de décitabine est cytotoxique, notamment de par la formation d'un grand nombre d'adduits de l'ADN formés lors du piège des DNMT1 [196, 197]. Cependant, à faible dose, le nombre d'adduits étant moins important, la décitabine va agir surtout via la réexpression des GST ou l'induction de différenciation cellulaire [198, 199]. Actuellement, 32 essais cliniques incluant cette molécule sont en cours pour le traitement des cancers (<http://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/clinical-trials/>), et comprennent notamment des combinaisons avec d'autres épiprodrogues [200-202].

Des études cliniques utilisant des doses relativement élevées de la décitabine chez les patients atteints de myéloдисplasies induit une myélosuppression assez sévère, et qui a freiné le développement de cette thérapie. Plus récemment, les doses d'injection ont été revues à la baisse, et montrent un effet intéressant puisque 30% des patients répondent au traitement (en particulièrement les patients atteints de myéloдисplasies à risque moyen ou élevé), contre 0% dans le groupe traité uniquement à l'aide de soins palliatifs. Enfin, grâce au développement exponentiel des technologies haut débit, une étude a montré que l'on peut prédire la réponse des patients à la décitabine par la caractérisation d'un ensemble de signatures moléculaires dans les CML [199].

1.2.5.2.3.2 Vidaza

L'azacytidine est également un analogue de nucléosides, et possède comme la décitabine un atome d'azote en C5 de la pyrimidine. Il s'agit d'un ribonucléoside, qui s'incorpore majoritairement dans les ARN (90% contre 10% seulement d'incorporation dans l'ADN). Comme la décitabine, l'azacytidine est un pro-médicament qui nécessite d'être phosphorylé par l'uridine-cytidine kinase pour être incorporé dans les acides nucléiques. Historiquement, cette molécule fut le premier agent déméthylant approuvé en clinique pour les syndromes myéloдисplasiques, et montre une efficacité puisqu'elle permet d'augmenter la survie globale des patients (51% contre seulement 26.2% dans le groupe contrôle).

1.2.5.2.3.3 Autres DNMTi

La 5-fluoro-2'-désoxycytidine est également un analogue de nucléoside pré-médicament en cours d'essai clinique, le plus souvent en combinaison avec la tétrahydouridine pour quelques cancers [203, 204]. La zébularine semble également montrer des effets positifs notamment chez les chiens (pas d'essai clinique chez l'homme).

Enfin, il existe un certain nombre de molécules non analogues de nucléosides qui ont montré un effet déméthylant dans des lignées cellulaires [205-207].

1.2.5.2.4 Autres molécules

Bien que les inhibiteurs de HDAC et de DNMT soient les plus étudiés, il existe d'autres catégories d'épiprodrogues.

Les inhibiteurs de SIRT bloquent pour la plupart SIRT1, et permettent l'arrêt de formation tumorale et l'apoptose via p53. Parmi elles, le sirtinol, ainsi que le cambinol et le salermide inhibent SIRT1 et 2, et montrent des résultats intéressants sur des lignées cellulaires [208], [209]. Enfin, les Tenovins 1 et 6 ont également montré des résultats dans des modèles animaux en monothérapie [210].

Trois petites molécules naturelles ont été décrites pour leur activité inhibitrice d'acétyltransférase d'histones. Il s'agit du curcumin, du garcinol et de l'acide anacardique. Le curcumin est efficace à la fois *in vitro* et *in vivo*, et son efficacité passe par ses différents effets notamment sur p53, sur la répression de EP300 et CREBBP, l'induction d'apoptose via la caspase 8 etc...

Les inhibiteurs de HMT, chaetocin, DZNep et BIX-01294 semblent également intervenir dans l'induction d'apoptose [211].

Enfin, il existe des inhibiteurs d'histone déméthylase, mais leur efficacité en tant qu'épiprodrogues n'est pas clarifiée.

Tel qu'il se présente, le futur des thérapies anticancer reposera d'ici quelques temps sur la combinaison de molécules épigénétiques et de chimiothérapies ciblant des voies particulièrement altérées dans les tumeurs. L'explosion des nouvelles technologies haut-débit laisse également

supposer de nombreuses améliorations cliniques en termes d'évaluation pronostiques de réponses à différents traitements, notamment épigénétiques.

Parmi toutes ces possibilités, il est très largement connu que les mécanismes d'apoptose sont fréquemment altérés dans les cancers. Parmi ces derniers figurent les voies des récepteurs à dépendance, dont les mystères ont fait l'objet d'une attention toute particulière ces quinze dernières années, notamment par l'équipe de Patrick Mehlen, l'un des fondateurs du paradigme des récepteurs à dépendance.

1.3 La voie négative du récepteur à dépendance UNC5B, une voie d'apoptose altérée dans les cancers.

1.3.1 Apoptose et cancers.

1.3.1.1 Apoptose, définition

Il existe, pour une cellule donnée, plusieurs manières de mourir (**Tableau 8**). D'un point de vue conceptuel, la mort cellulaire est définie comme la dégénérescence permanente des fonctions cellulaires vitales. De manière plus pragmatique, la limite exacte entre une altération réversible pour l'homéostasie et une perte irréversible des activités cellulaires semble impossible à définir. Afin de contourner ce problème, il semble nécessaire de bien définir ce qu'est une cellule morte, qui doit posséder une ou plusieurs des caractéristiques suivantes :

- La perte permanente des fonctions de barrière de la membrane plasmique
- La détérioration des cellules en petits fragments communément appelés corps apoptotiques
- L'engloutissement des cellules par des phagocytes (professionnels ou autres). Cet aspect n'est néanmoins pas forcément suffisant ; sous certaines conditions, les cellules phagocytées ne seront pas dégradées par le protéasome et peuvent dans certains cas être relarguées encore vivantes [212].

| La mort cellulaire programmée | | | |
|--------------------------------------|------------------------------|---|---|
| Mourir discrètement | Apoptose extrinsèque | Dépendante des récepteurs de mort : <i>Fas, TNFR, TRAILR</i> | Activation des caspases initiatrices (-8 et -10) et exécutrices (-3, -6 et -7). |
| | Apoptose intrinsèque | Dépendante des mitochondries : – <i>dommages à l'ADN</i> – <i>stress oxydatif</i> | Perméabilisation de la membrane interne mitochondriale contrôlée par les membres de la famille Bcl-2. Sortie d'effecteurs mitochondriaux (ex : cytochrome c, AIF). Dépendante des caspases |
| | Anoïkis | Dépendante des signaux de la MEC | Ne concerne que les cellules adhérentes. Activée par des molécules qui participent à l'apoptose intrinsèque, dont les caspases. Elle survient lorsque l'intégrine-β1 ou des facteurs de croissance (EGF) ne sont plus stimulés. |
| Mourir brutalement | Nécrose programmée | Nécroptose : récepteurs de mort : <i>Fas, TNFR, TRAILR</i> | Passe par l'activation du nécrosome (RIP1 et/ou RIP3). |
| | | Nécrose programmée intrinsèque : <i>stress génotoxiques</i> | Dépendante de PARP-1 et AIF, est déclenchée en absence d'activation des caspases |
| | | Autres | Mort régulée avec gonflement des organites intracellulaires et perte de l'intégrité membranaire |
| Mourir finalement | Autophagie | Conditions de stress <i>(ex: manque de nutriments)</i> | Autodigestion lysosomale. |
| | Catastrophe mitotique | Mitose aberrante | Arrêt du cycle cellulaire après une mitose aberrante qui peut conduire à l'apoptose, la nécrose ou la sénescence. |
| | Entosis | Cannibalisme cellulaire provoqué par la perte d'interaction avec la MEC | Phagocytose (par des cellules non spécialisées) suivie de la dégradation lysosomale des cellules. |
| Mourir singulièrement | Netosis | Formation des pièges extracellulaires neutrophiles (NET) | La sécrétion de NET (constitués d'histones, de protéines antimicrobiennes et de chromatine) peut conduire à la mort des granulocytes . |
| | Cornification | Processus de différenciation terminale des kératinocytes | Activation de la caspase-14 et des transglutaminases 1, 3, et 5 |
| | Pyroptosis | Initiée par l'inflammasome dans des macrophages infectés par des bactéries | Dépend de l'activation de la caspase-1 et passe par la sécrétion d'IL1 β et d'IL18. |

Tableau 8 : Classification et caractéristiques des différents types de mort cellulaire programmée. D'après [216].

La mort cellulaire peut être accidentelle ou régulée (ACD ou RCD, respectivement). Les morts accidentelles peuvent résulter d'une exposition à des contraintes physiques (température, pression), chimiques (pH, détergents) ou mécaniques. La mort est alors théoriquement immédiate et irrémédiable.

A l'inverse, la mort cellulaire régulée (RCD) implique une machinerie moléculaire génétiquement codée, et régulée. Parmi les RCD, l'apoptose, représente le processus permettant à des cellules de déclencher, de manière physiologique et génétiquement programmée, leur suicide en réponse à un signal. C'est un processus métabolique conservé, et qui joue un rôle majeur dans le développement embryonnaire ainsi que l'homéostasie tissulaire. Ainsi, les dysfonctionnements des systèmes apoptotiques contribuent de manière importante à l'émergence de maladies, dont les cancers [49], [213]. Ce phénomène est exécuté par une cascade d'activation de caspases [214] engendrée par des voies apoptotiques initiatrices intrinsèques (mitochondriale) ou extrinsèques.

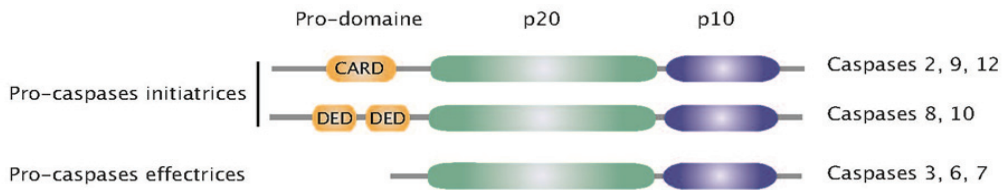
La voie apoptotique intrinsèque consiste à l'engagement des caspases via la perméabilisation de la membrane externe des mitochondries (MOMP), et est régulée par les protéines de la famille BCL-2 de manière complexe par un réseau d'interactions entre les membres pro- et anti- apoptotiques, en réponse à des dommages à l'ADN sévères ou un stress cellulaire [215].

La voie apoptotique extrinsèque active les caspases par l'intermédiaire de récepteurs localisés à la surface membranaire des cellules en réponse à la liaison avec leur ligand de mort, exprimés par les cellules effectrices de l'immunité (Fas, TNFR, TRAILR...) [213], [216], [215], (Tableau 8).

1.3.1.2 Les principaux acteurs de l'apoptose

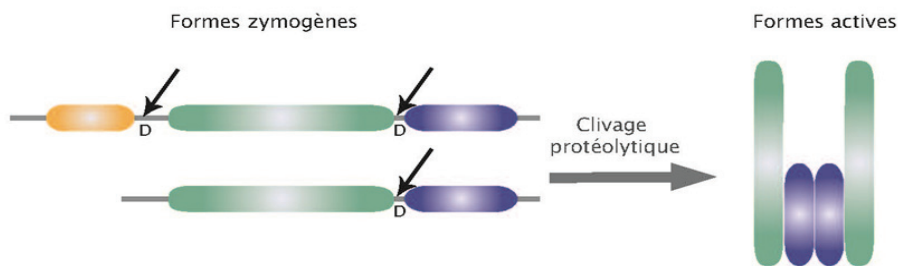
Lorsque l'on parle d'apoptose, il est nécessaire de distinguer les mécanismes d'initiation et d'exécution. L'initiation de l'apoptose fait généralement référence aux événements de transduction de signal qui permettent l'activation des exécutants. Par exemple, l'activation de la caspase-8 au cours de l'apoptose induite par le ligand FAS (FASL) est considérée comme un événement initiateur, tandis que l'activation de la caspase-3 qui suit correspond à un événement d'exécution de l'apoptose [212]. En ce qui concerne l'initiation de l'apoptose, il existe deux voies principales menant à l'apoptose via les caspases exécutrices : les voies extrinsèques et intrinsèques (ou mitochondriale).

A. Formes zymogènes des caspases apoptotiques



B. Activation des caspases apoptotiques

1. Activation par clivage protéolytique



2. Activation par agrégation

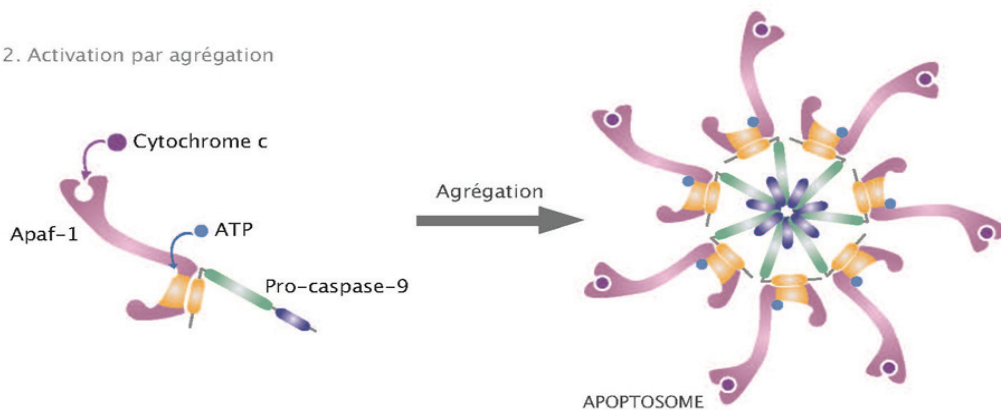


Figure 22 : Structure et activation des caspases. A. Structure protéique des caspases. Les caspases initiatrices possèdent une grande sous-unité p20, une petite sous-unité p10 et un pro-domaine long comprenant un motif CARD (CASPase Recruitment Domain) ou deux motifs DED (Death Effector Domain) selon les caspases. Ces motifs permettent le recrutement des pro-caspases sur différents complexes apoptotiques. Les caspases effectrices possèdent elles un pro-domaine court, et des sous-unités p20 et p10. B. Activation des caspases. A l'exception de la pro-caspase-9, les pro-caspases initiatrices (zymogènes) sont activées par auto-clivage protéolytique (flèches) au niveau d'acides aspartiques (D). Le clivage des caspases effectrices est effectué par les caspases initiatrices actives. La pro-caspase-9 n'est pas activée par clivage mais par agrégation sous forme heptamérique avec la protéine Apaf-1, elle-même associée au cytochrome C et à l'ATP. Ce complexe est appelé apoptosome.

1.3.1.2.1 Les caspases, des effecteurs clés de l'apoptose

Les caspases sont exprimées de manière constitutive sous forme inactive dans les cellules (on parle alors de zymogène ou pro-caspase). Chez les mammifères, 14 caspases sont décrites, et présentent des similarités de séquence, structure ainsi qu'une spécificité de substrat. Sous forme inactive, les caspases sont constituées d'un peptide à trois domaines : un prodomaine N-terminal, une grande sous-unité p20 et une petite sous-unité p10. Les pro-caspases sont activées par clivage, et clivent à leur tour leur substrat après reconnaissance d'un motif spécifique. Il existe deux groupes de caspases : les initiatrices (caspases 2, 8, 9, 10 et 12) et les effectrices (caspases 3, 6 et 7), [217] (**Figure 22**).

Les caspases initiatrices sont constituées d'un prodomaine contenant des motifs CARD (Caspase Recruitment Domain) (caspases 2, 9 et 12), ou un domaine effecteur de mort (DED), (caspases 8 et 10). Les motifs CARD et DED permettent le recrutement des caspases initiatrices au niveau de complexes activateurs de l'apoptose. Ce regroupement permet de concentrer ces protéines sur un site donné, ce qui favorise leur auto-activation [214].

Les caspases effectrices, elles, sont activées par clivage via les caspases initiatrices, ce qui permet la propagation des signaux apoptotiques. Elles clivent à leur tour de nombreux substrats comme par exemple les endonucléases CAD (Caspase Activated DNase) et des protéases (Gelsolin), qui vont à leur tour permettre la fragmentation de l'ADN ainsi que la dégradation du cytosquelette.

1.3.1.2.2 Voie extrinsèque

La voie extrinsèque est initiée par l'activation de récepteurs transmembranaires de la superfamille TNF-R (Tumor Necrosis Factor Receptor). Ces récepteurs (Fas, TNF-R1, TRAMP, TRAIL-R1, TRAIL-R2, DR-6, EDA-R et NGF-R) ont en commun leur domaine de mort (Death Domain) qui a un rôle majeur dans la transmission du signal apoptotique [218].

L'activation de la voie extrinsèque est induite par la fixation d'un ligand (soluble ou transmembranaire) à son récepteur de mort. Le ligand est le plus souvent sous forme trimérique lorsqu'il se fixe à son récepteur lui-même homotrimérisé, ce qui entraîne la formation d'un complexe sous-membranaire activateur des caspases initiatrices. Ce complexe est lié au récepteur via son domaine de mort (DD), et va lier les procaspases initiatrices 8 et 10 via un domaine effecteur de mort (DED), formant alors un complexe appelé DISC (Death Inducing Signaling

Complex), [218]. Les pro-caspases 8 et 10 s'activent par clivage autoprotéolytique pour former les caspases 8 et 10 qui vont à leur tour activer les caspases effectrices 3 et 7.

Il existe des formes de récepteurs de mort tronqués dits « leurres » notamment pour TRAIL (TRAILR 3 et 4) et FasL (DcR3, Decoy Receptor 3) correspondant à la partie extracellulaire des récepteurs. Ces derniers entrent en compétition avec les récepteurs de mort pour la liaison au ligand. Ils ont donc indirectement un rôle anti-apoptotique [219].

Il existe également d'autres voies d'inhibition de l'apoptose : par exemple, l'homologue de la caspase 8 ; c-Flip (cellular FLICE/Caspase 8 Inhibitory Protein), peut inhiber cette voie de signalisation en se couplant au complexe sous membranaire associé à la pro-caspase-8, inhibant ainsi la signalisation [220]. L'activité des caspases effectrices 3, 7 et 9 peut également être régulée négativement par la famille des protéines inhibitrices de l'apoptose IAPs (Inhibitor of Apoptosis Proteins), telles que XIAP (X-linked IAP) et Survivine [221] (**Figure 23**).

1.3.1.2.3 Voie intrinsèque

La voie intrinsèque peut être activée en réponse à divers stress cellulaires (choc thermique, radiations, hypoxie, absence de facteurs de croissance, agents cytotoxiques...) et à des dommages sévères de l'ADN.

Ces stimuli ont pour conséquence une perméabilisation de la membrane mitochondriale externe (MOMP), ce qui entraîne le relargage vers le cytosol cellulaire de différentes molécules régulatrices dont le cytochrome C. Ce dernier s'associe alors avec Apaf-1 (Apoptosis Protease Activating Factor-1), de manière ATP dépendante, permettant ainsi le recrutement de pro-caspases-9. Ces dernières, une fois complexées sous forme heptamériques en une structure appelée apoptosome (composée de 7 complexes cytochrome C/ Apaf-1/ ATP/ pro-caspase-9 structurés en forme d'étoile) (**Figure 19**) vont permettre l'activation de la caspase-9 qui va activer par clivage des caspases effectrices (**Figure 23**).

En parallèle, d'autres molécules régulatrices relarguées par la mitochondrie lors de la perméabilisation de sa membrane externe vont également faciliter l'activation des caspases effectrices en inhibant les IAPs (Smac/Diablo et HtrA2/Omi) [222], ou de manière un peu plus tardive vont entrer dans le noyau pour y amorcer la fragmentation de l'ADN ((AIF (Apoptosis Inducing Factor) et l'endonucléase G). La fragmentation de l'ADN est ensuite achevée par le complexe ICAD, une fois activé par clivage via les caspases effectrices. Ce clivage permet le relargage d'une sous unité appelée CAD (Caspase Activated DNase) capable d'entrer dans le noyau pour y digérer l'ADN et condenser la chromatine [223].

La voie intrinsèque est étroitement régulée par les membres de la famille Bcl-2, par l'intermédiaire d'un réseau d'interactions mutuellement exclusives, et non équivalentes entre les membres pro- et anti-apoptotiques de cette famille [215]. Les protéines de cette famille ont toutes en commun au moins une des quatre régions homologues BH-1 à 4 (Bcl homology), qui permettent la multimérisation entre les membres de la famille. Les protéines Bcl-2 anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-X, Bcl-XL, Bcl-w...) possèdent les quatre domaines BH tandis que les membres pro-apoptotiques multi-domaines (Bax, Bak) ont en commun les domaines BH1, 2 et 3.

Une seconde classe de protéines Bcl-2 pro-apoptotiques, dites « BH3-only » (Bid, Bad, Bim, Noxa, Puma...) comporte un seul domaine BH3. Les membres pro-apoptotiques multi-domaines (Bax, Bak) sont nécessaires pour le MOMP, puisqu'ils forment des pores dans la membrane mitochondriale et permettent ainsi le relargage du des molécules régulatrices mitochondriales, et notamment le cytochrome c.

Ce processus est régulé négativement par les protéines Bcl-2 anti-apoptotiques, qui lient et neutralisent les protéines de type Bax/Bak. Lors de l'induction de la voie apoptotique mitochondriale, les protéines BH3-only inhibent la fonction anti-apoptotique des protéines Bcl-2 en se liant à elles, via leur domaine BH3 [224]. Certaines des protéines Bcl-2 sont également à l'origine d'une discussion croisée entre les voies intrinsèques et extrinsèques. Par exemple, la caspase 8 est capable de cliver Bid, qui va alors inhiber les protéines Bcl-2 anti-apoptotiques [225].

1.3.1.3 Apoptose et cancers, de nombreuses altérations liées au développement tumoral

L'apoptose a un rôle majeur chez les organismes pluricellulaires, au cours du développement puis chez l'adulte. A l'inverse, les dérèglements des voies de signalisation apoptotique sont impliqués dans de nombreuses pathologies, notamment chez l'homme. Ainsi, un excès d'apoptose représente un évènement majeur dans le développement d'anomalies neurodégénératives (notamment les AVC, Huntington, Parkinson et Alzheimer), et cardiaques (ischémies, crises cardiaques, infections...) [226]. Des déficits en apoptose sont, en revanche, associés à certaines maladies auto-immunes (absence de sélection négative des lymphocytes auto-réactifs), mais surtout observés dans les cancers.

En effet, le nombre de cellules d'un individu est issu de l'équilibre entre prolifération et mort cellulaire. La perte de cet équilibre, lorsqu'elle est en faveur de la prolifération cellulaire et/ou en la défaveur de la mort cellulaire peut engendrer le développement tumoral. Ainsi, l'émergence d'altérations de gènes impliqués dans l'apoptose joue également un rôle dans la tumorigénèse ; on parle une fois de plus d'oncogènes et de GST (**Figure 24**).

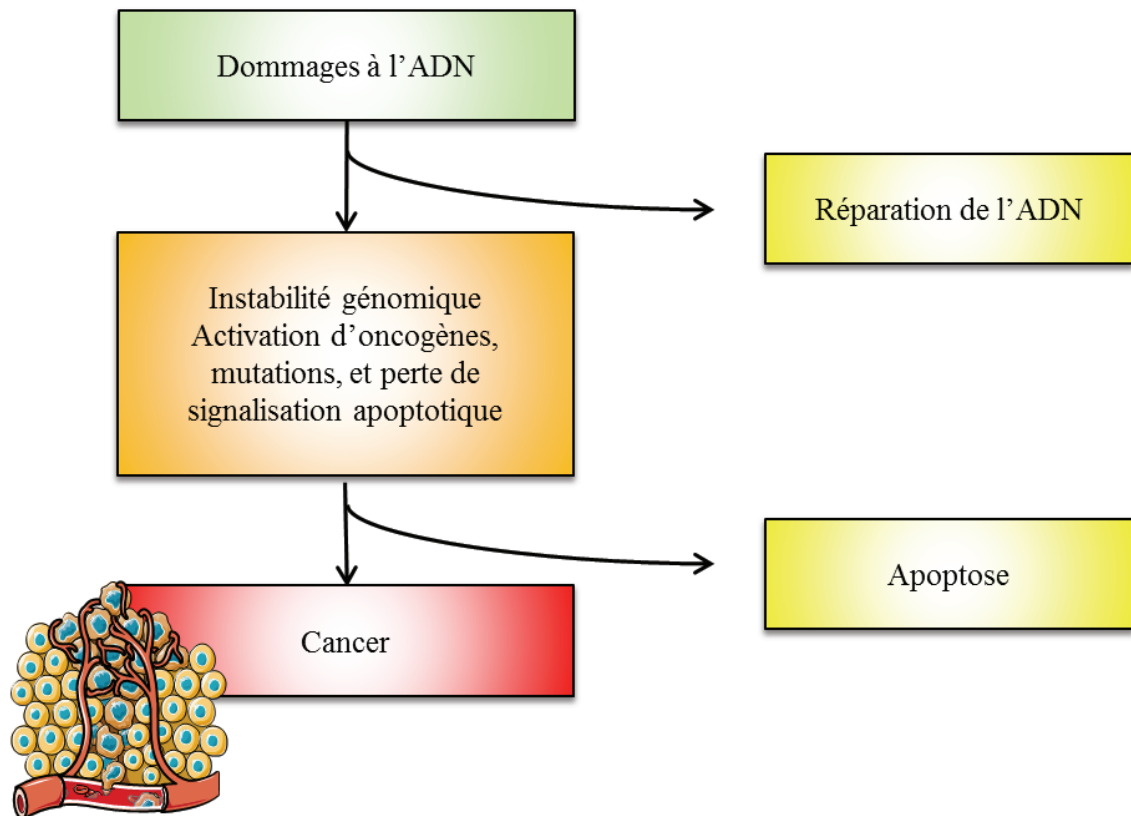


Figure 24 : l'apoptose, un rôle majeur dans la cancérogénèse. Pour faire face aux dommages à l'ADN, les cellules ont évoluées et développées des systèmes sophistiqués de réparation de l'ADN. L'échec de ces systèmes entraîne une instabilité génomique, qui induit l'apoptose dans des conditions normales. Si des mutations de protéines clés de la signalisation apoptotique apparaissent, et sont accompagnées d'activation(s) oncogénique(s), le développement tumoral semble être un scénario observable.

De nombreuses études montrent l'implication d'un défaut d'apoptose, dans la croissance et la progression tumorale [227], l'échappement métastatique [228] [229] et la résistance aux thérapies anticancéreuses [228], [230], [215].

Parmi les mécanismes impliqués dans des défauts d'apoptose, les altérations épigénétiques sont omniprésentes et interviennent dans le développement tumoral notamment via l'inhibition de gènes pro-apoptotiques.

1.3.1.3.1 Inhibition de la voie extrinsèque d'apoptose par hyperméthylation de gènes, quelques exemples.

Les ligands transduisant des signaux de mort tels que CD95 se lient sur leur récepteur, engageant le death-inducing signalling complex ou DISC qui va alors activer la caspase 8 activatrice des caspases effectrices, induisant l'apoptose.

L'hyperméthylation d'ilots CpG situés sur le promoteur de la caspase-8 a été identifiée par MSP (Methylation specific PCR) à partir d'échantillons de tumeurs issus de patients atteints de glioblastome multiforme, en comparaison avec les tissus sains correspondants. La caspase-8 voit également son promoteur hyperméthylé dans 40% des neuroblastomes et médulloblastomes. Il en est de même pour les récepteurs de mort DR4 et 5, hyperméthylés dans 66,7% des neuroblastomes [231]. Il existe donc un lien entre perte de la voie extrinsèque d'apoptose et méthylation pour un certain nombre de cancers.

1.3.1.3.2 Inhibition de la voie intrinsèque d'apoptose par hyperméthylation de gènes

La voie d'apoptose intrinsèque activée en réponse à divers stimuli dont le stress génotoxique est régulée par p53, et associée au relargage de *cytochrome c*. Ce relargage permet la formation d'un complexe d'activation des caspases appelé apoptosome. p53 régule ainsi l'expression de nombreux gènes pro- et anti-apoptotiques, dont certains ont leur promoteur hyperméthylé dans les cancers.

Par exemple, il a été montré que les promoteurs de gènes appartenant à la voie DAPK-p14-p53 sont hyperméthylés dans 70% des lymphomes de type B familiaux et sporadiques pour DAPK1 et dans 10 à 30% des cancers colorectaux, des reins et de l'estomac pour p14 [232]. Il a également été montré que dans les cellules de cancer colorectales RKO, p14ARF est rendu silencieux par hyperméthylation de son promoteur. De plus, la protéine MBD2 s'associe au promoteur méthylé de p14ARF, et la perte d'expression de MBD2 par interférence à l'ARN permet l'augmentation du taux d'expression de p14ARF. Enfin, l'expression de p14ARF peut être restaurée par réexpression de MBD2 dans des cellules déficientes pour la protéine. Ces résultats suggèrent que la protéine MBD2 est impliquée dans la perte d'expression du gène suppresseur de tumeurs p14ARF [233].

1.3.1.3 Exploitation des défauts d'apoptose en thérapie anticancéreuse

Les cellules tumorales peuvent acquérir différents mécanismes d'évasion à l'apoptose. Ces altérations, si elles sont identifiées, peuvent être contournées afin de réactiver les voies de mort cellulaire dans les cellules transformées, ce qui représente une stratégie thérapeutique pertinente. Depuis une vingtaine d'années, des approches moléculaires ont été développées dans le but de réengager les voies apoptotiques dans les cellules tumorales.

L'identification des altérations directement impliquées dans les défauts d'apoptose des cellules tumorales a permis d'identifier de nombreuses cibles thérapeutiques potentielles, et, par conséquent, de concevoir de nouvelles thérapies basées sur la restauration d'une voie apoptotique fonctionnelle. La limite étant que l'apoptose étant un mécanisme inhérent à toutes les cellules, il s'agit donc d'induire spécifiquement l'apoptose des cellules tumorales tout en préservant les cellules saines. Ainsi, les thérapies axées sur les acteurs de l'apoptose s'inscrivent dans le champ des nouvelles thérapies dites « ciblées » sur des anomalies biologiques spécifiques des cellules tumorales (**Figures 25 et 26**), [234], [219], [215]. Il semblerait néanmoins qu'un certain nombre d'entre elles (en particulier les agonistes des récepteurs de mort), se montrent malheureusement peu efficaces en clinique [213]. Il est intéressant de noter également que l'utilisation de certaines épidoques permet d'induire l'apoptose des cellules tumorales.

Il existe d'autres voies de signalisation apoptotiques non décrites ci-dessus. Parmi elles, la voie des récepteurs a suscité l'intérêt des chercheurs depuis une quinzaine d'années. L'altération des différents récepteurs à dépendance, de leur(s) ligand(s) et de leurs partenaires pro-apoptotiques est fréquemment observée dans les cancers, et suggère une importance de ces derniers dans les mécanismes de tumorigénèse et agressivité des tumeurs.

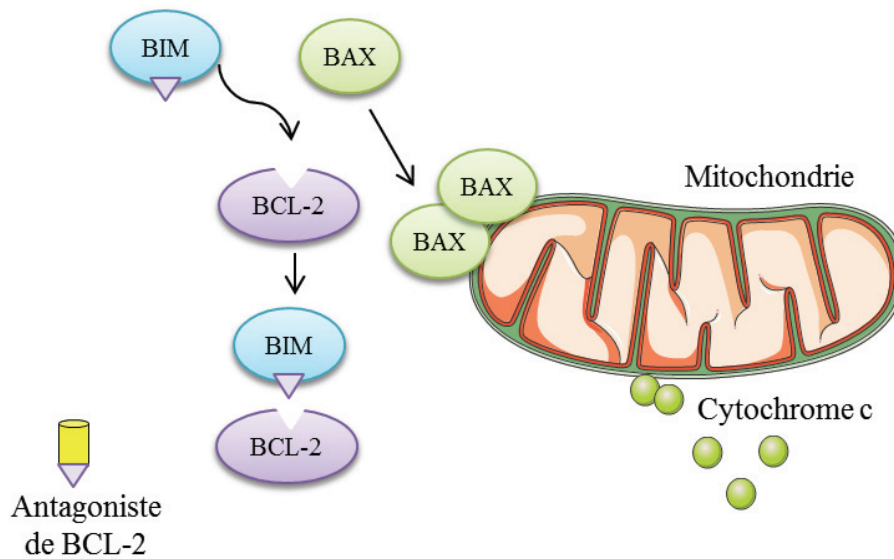


Figure 26 : Contrôle du relargage du cytochrome c. Ce schéma montre comment des protéines à domaine BH3 unique telles que BIM interagissent avec BCL-2 afin de permettre la libération de BAX, qui va à son tour permettre le relargage du cytochrome c. C'est grâce à la compréhension de ce type de mécanisme que des petites molécules antagonistes de BCL-2, telle que l'ABT737, ont pu être élaborées. D'après [349].

1.3.2 Les récepteurs à dépendance, une famille fonctionnelle impliquée dans la mort cellulaire.

Généralement, les récepteurs transmembranaires n'induisent une signalisation intracellulaire qu'en présence de leur ligand, et ne sont pas actifs en son absence. En 1998, Dale Bredesen et Patrick Mehlen ont proposé le paradigme selon lequel certains récepteurs sont actifs en la présence de leur ligand, mais également en son absence. Ces récepteurs peuvent ainsi transduire différentes voies de signalisation selon la disponibilité du ligand. C'est ainsi que fut introduite la notion de récepteurs à dépendance, caractérisée par la capacité des récepteurs à induire, outre la signalisation classique dite positive en présence de leur ligand, une signalisation dite négative en absence de ce dernier, aboutissant à l'élimination des cellules par apoptose. Les cellules exprimant ces récepteurs sont donc dépendantes de la présence du ligand pour survivre (**Figure 27**).

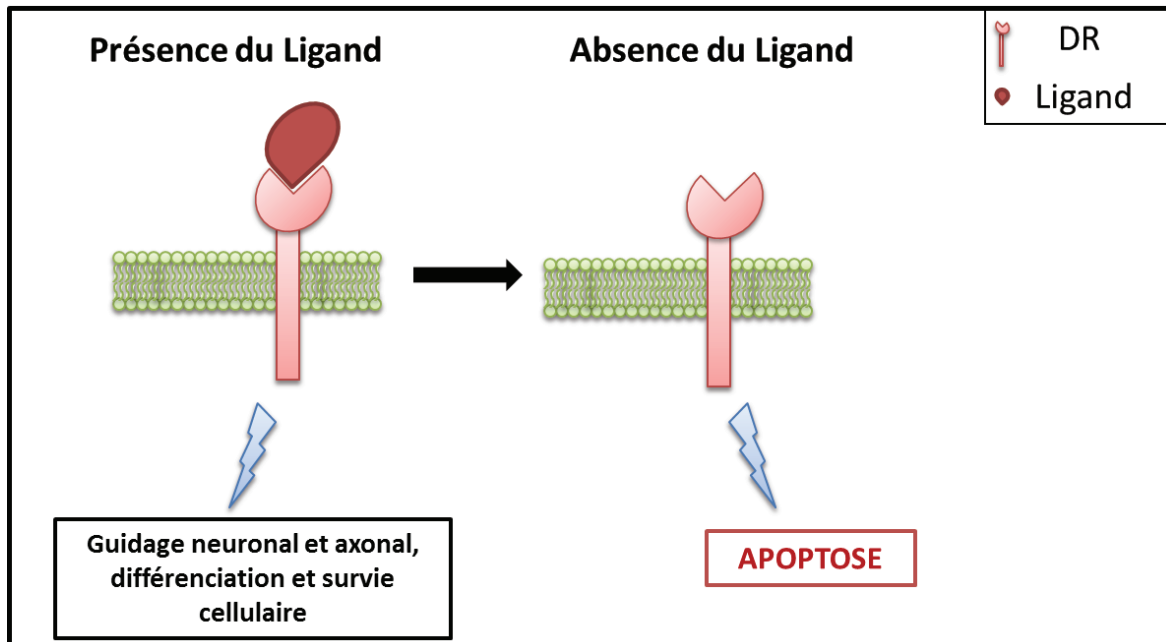


Figure 27 : Concept des récepteurs à dépendance. Les récepteurs à dépendance, majoritairement transmembranaires, sont caractérisés par une double signalisation, positive et négative, selon la disponibilité du ligand : en présence de leur ligand, ils induisent un signal positif permettant la survie, la prolifération, la migration et/ou la différenciation cellulaire tandis qu'en absence du ligand, ils activent une voie de signalisation apoptotique.

1.3.2.1 La grande famille des récepteurs à dépendance

La famille fonctionnelle des récepteurs à dépendance comporte actuellement une vingtaine de membres. Ils sont pour la plupart transmembranaires, et ne présentent pas d'homologie de structure ou de séquence. Le premier qui fut caractérisé est le récepteur aux neurotrophines p75^{NTR} et son ligand NGF [235]. Plus récemment, des travaux ont cependant remis en cause la bivalence fonctionnelle de ces récepteurs [236]. En 1998, le récepteur DCC fut qualifié de récepteur à dépendance envers son ligand, la nétrine-1 par Dale Bredesen et Patrick Mehlen [237], et de nombreuses études ont étayé cette observation depuis [238] [239].

Actuellement, on dénombre une vingtaine de récepteurs à dépendance (**Figure 28 et tableau 9**), dont :

- P75^{NTR}, capable de se lier au facteur de croissance NGF (Nerve growth Factor), bien que la fonction de récepteur à dépendance de ce dernier soit discutée.

- DCC (Deleted in Colorectal Cancer) ainsi que les récepteurs UNC5A à D (Uncoordinated-5 Homologs), capables de reconnaître le ligand nétrine-1 principalement [237, 240, 241].
- Plusieurs récepteurs à activité tyrosine kinase :
 - o RET (REarranged during Transfection), spécifique du ligand GDNF (Glial cell Derived Neurotrophic Factor) [242, 243].
 - o MET (MNNG HOS Transforming gene) liant le ligand HGF/SF (Hepatocyte Growth Factor / Scattered Factor) [244, 245].
 - o Le récepteur ALK (Anaplastic Lymphoma Kinase) dont le ligand est toujours inconnu, bien que plusieurs molécules aient été soupçonnées. [246].
 - o Les récepteurs TrkC et TrkA (Tyrosine receptor kinase A et C) respectivement dépendants vis-à-vis des ligands NT-3 (Neurotrophine 3) [247] [248] et NGF [249].
 - o L'éphrineA4 (EphA4), dont le ligand connu est l'éphrine B3 [250].
 - o La sémaphorine 3E dépendante du ligand Plexine-D1 [251].
 - o Les récepteurs à l'insuline IR et IGF1R (respectivement Insulin Receptor et Insulin-like Growth Factor Receptor I) dépendant des ligands insuline et IGF-1 (Insulin-like Growth Factor1) [252], semblent également se comporter comme des récepteurs à dépendance, bien que ce sujet soit controversé.
 - o Le récepteur aux Androgènes (AR), un récepteur intracellulaire dont les ligands correspondant aux hormones progestérone et testostérone [253] [254]
 - o les intégrines $\alpha\beta3$ et $\alpha5\beta1$, spécifiques de composants de la matrice cellulaire [255].
 - o Patched (PTCH) et CDO (Cell-adhesion molecule-related/Downregulated by Oncogenes) tous deux dépendants du ligand SHH (Sonic Hedgehog) [256-259].
 - o Le récepteur Néogénine, dont le ligand principal est la molécule de guidage RGMa (Repulsive Guidance Molecule), mais qui est également capable de lier avec une affinité plus faible RGMb et RGMc ainsi que les nétrines 1, 3 et 4 [260].

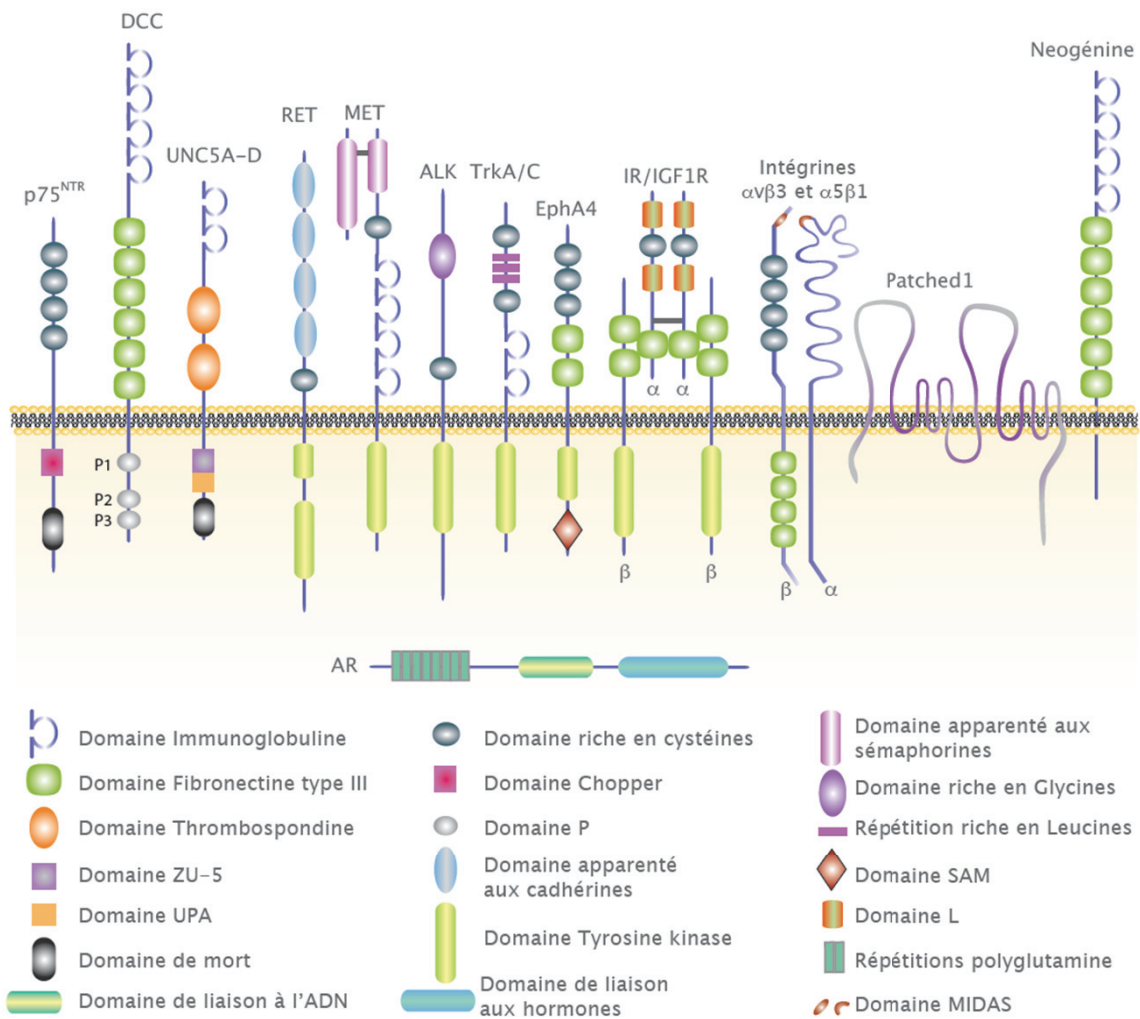


Figure 28 : Membres de la famille fonctionnelle des récepteurs à dépendance. L'ensemble des récepteurs à dépendance partagent des caractéristiques fonctionnelles, mais sont très variables en termes de structure. ZU : Zona occludens/UNC5 homology domain; UPA : UNC5, PIDD, Ankyrins; SAM : Sterile Alpha Motif; MIDAS : Metal Ion-Dependent Adhesion Site.

| Récepteur à Dépendance | Ligand | Partenaire(s) pro-apoptotiques |
|--|--|-------------------------------------|
| p75 ^{NTR} | NGF | NRAGE ? |
| DCC | nétrine-1, nétrine-4 | DIP13a |
| UNC5A | | NRAGE |
| UNC5B | | DAPK |
| UNC5C | | |
| UNC5D | | |
| RET | | GDNF, neurturin, artemin, persephin |
| MET | HGF/SF | <i>nd</i> |
| ALK | pleiotrophin, midkin, jeb ? | <i>nd</i> |
| TrkC | NT-3 | Cobra-1 |
| TrkA | NGF | p75 |
| EphA4 | EphB3 | <i>nd</i> |
| AR | Androgène | <i>nd</i> |
| Intégrines $\alpha\beta3$ et $\alpha5\beta1$ | Composants MEC, avb3 | <i>nd</i> |
| Patched | SHH | DRAL/TUCAN/NALP1 |
| CDO | | <i>nd</i> |
| Néogénine | RGMa, RGMb, RGMc, netrin-1, netrin-3, netrin-4 | DAPK |

Tableau 9 : Les récepteurs à dépendance et leur(s) ligand(s)

1.3.2.2 Localisation des récepteurs à dépendance

Comme beaucoup de récepteurs transmembranaires, la localisation à la membrane cellulaire de certains récepteurs à dépendance se ferait préférentiellement au niveau de microdomaines membranaires appelés radeaux lipidiques. Ces derniers présentent des compositions lipidiques et protéiques particulières, avec un enrichissement en cholestérol, phospholipides et sphingolipides ; ils sont le siège de recrutement et de concentration de nombreuses protéines impliquées dans des processus cellulaires tels que l'exocytose, l'endocytose, la transduction du signal ou encore l'apoptose. Les radeaux lipidiques constituent donc de véritables plateformes de signalisation favorisant la formation de complexes protéiques initiant la transduction d'un signal. À ce titre, la répartition des récepteurs à dépendance dans ces structures permettrait à la fois l'induction de leurs signalisations positive et négative [261].

Les récepteurs à dépendance ont en commun d'être impliqués à la fois dans le développement du système nerveux et dans des processus de développement tumoral. Les plus étudiés sont ceux spécifiques du ligand nétrine-1 en raison des défauts de développement du système nerveux occasionnés lors de mutation chez la souris, c'est-à-dire DCC, la néogénine et UNC5H. Au cours de ce manuscrit, les orthologues d'UNC5 humains et murins seront désignés par le terme UNC5H.

1.3.3 La nétrine-1 et ses récepteurs

1.3.3.1 Les récepteurs de la nétrine, structure, profils d'expression et rôles physiologiques

1.3.3.1.1 Les nétrines

La famille des nétrines regroupe un ensemble de molécules sécrétées, dont la structure est proche des protéines de type laminine que l'on retrouve au niveau des membranes basales (**Figure 29**). Ces protéines ont été très conservées au cours de l'évolution, et sont de taille similaire (environ 70 kDa). Elles possèdent trois domaines : un domaine VI, un domaine V contenant les motifs EGF (Epidermal Growth Factor) : V1, V2 et V3 ainsi qu'un domaine C, riche en acides aminés basiques (et qui représenteraient des sites de fixation pour les molécules de la MEC et de la surface cellulaire chargées négativement).

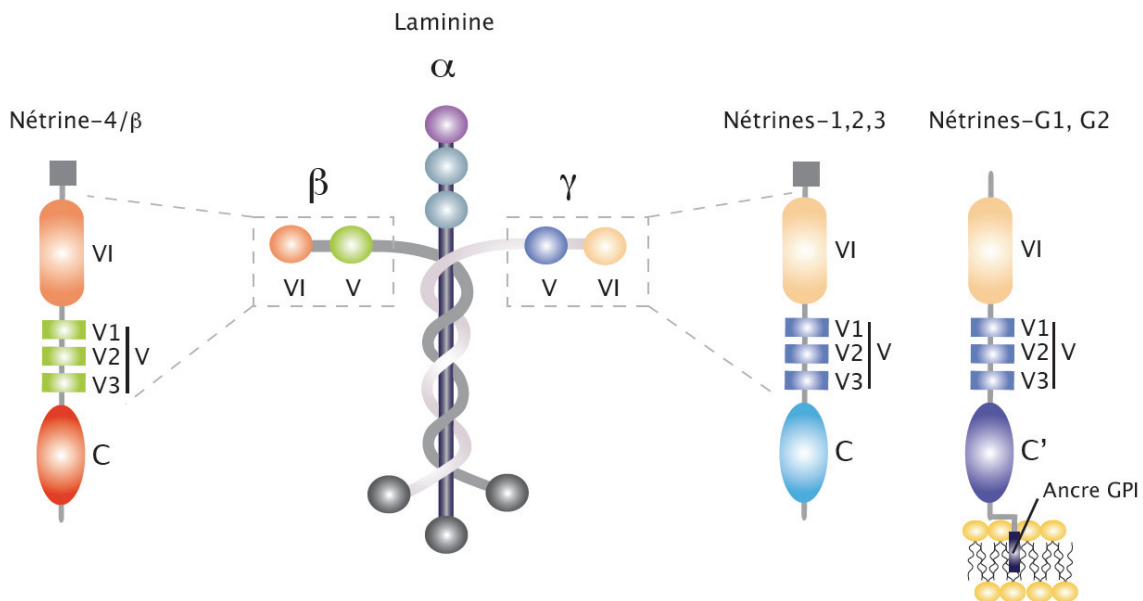


Figure 29 : Structure des nétrines

La laminine est une protéine hétérotrimérique composée de chaînes α , β et γ . Les domaines VI et V des nétrines sont similaires soit à la chaîne β (nétrine-4/ β) ou à la chaîne α (Nétrines 1, 2, 3, G1 et G2) de la laminine. Les nétrines G sont en plus, ancrées à la membrane plasmique via une ancre GPI (Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol).

Un grand nombre d'études sur ces molécules ont permis de montrer leur rôle au cours de l'évolution des espèces à symétrie bilatérale, et en particulier leur rôle majeur au cours du développement du système nerveux central (SNC) en guidant les axones vers la ligne médiane. En 1990, la première forme de nétrine, Unc-6, fut décrite chez *C. elegans* pour son implication dans le guidage axonal et la migration neuronale [262]. Depuis, cela, le rôle des nétrines dans le développement d'un grand nombre d'espèces animales a été établi [263].

Mes travaux de thèse sont dirigés particulièrement sur la nétrine-1, qui se trouve également être la nétrine la plus étudiée.

1.3.3.1.1.1 Nétrine-1 et développement

La nétrine-1 est exprimée dans de nombreuses régions du système nerveux central (SNC) (systèmes visuels, olfactifs, mais également le cervelet, le prosencéphale ou le tube neural) au

cours du développement, ou elle est impliquée dans le guidage axonal et neuronal [264] [265]. Elle est également impliquée dans le développement du système nerveux périphérique (mise en place du système nerveux entérique, migration des cellules dérivées des crêtes neurales etc...). Enfin, la nétrine-1 est également exprimée dans des tissus non nerveux, ou elle est impliquée dans la morphogénèse, l'angiogénèse et la vasculogénèse (pancréas, poumons, glande mammaire en développement, cellules endothéliales [266] ... L'inactivation de la nétrine-1 chez la souris induit, de manière non surprenante, une létalité périnatale [267] (**Tableau 10**).

| | Phénotype | létal? | Référence |
|--------------------------|--|----------------|-----------|
| Ntn1 -/- | Défauts de projection axonale, de locomotion et de développement du système nerveux | Oui périnatale | [267] |
| Dapk1 -/- | Diminution de la mort cellulaire induite par un stress du RE | Non | [351] |
| Unc5A -/- | Diminution d'apoptose des neurones et défauts du développement de la moelle épinière | Oui | [352] |
| Unc5B -/- | Arrêt de développement total à E10 ou E12,5 | Oui | [353] |
| Unc5C ^{rcm/rcm} | Malformations rostrales cérébelleuses, ataxie aggrave l'agressivité des tumeurs dans un contexte Apc ^{min} de prédisposition aux cancer colorectaux | Non | [354] |
| | | | [287] |
| Dcc -/- | Défauts de projection axonale / développement du système nerveux | Oui périnatal | [287] |

Tableau 10 : phénotypes des mutants de la voie des récepteurs à dépendance spécifiques de la nétrine, et le partenaire pro-apoptotique d'UNC5B : DAPK1 (Death Associated Protein Kinase).

1.3.3.1.1.2 Nétrine-1 chez l'adulte

Chez l'homme adulte, la nétrine est globalement exprimée à de faibles taux. On la détecte néanmoins, en plus du système nerveux, dans certains tissus comme le colon, l'intestin grêle, le pancréas, les reins, la glande mammaire, les poumons etc [268] ...

La nétrine-1 est capable de se lier à ses récepteurs spécifiques afin de transduire différents signaux. Il existe d'autres récepteurs capables de lier la nétrine-1 (Néogénine, DSCAM, A2b et les intégrines $\alpha6\beta4$ et $\alpha3\beta1$). Toutefois, dans cette partie, nous nous intéresserons uniquement aux récepteurs de la nétrine-1 de type « récepteurs à dépendance », et plus particulièrement à DCC et UNC5H (**Figure 24**).

1.3.3.1.2 Deleted in Colorectal Cancer, DCC

DCC est un récepteur transmembranaire de type I de 175 à 190 kDa possédant plusieurs isoformes. Coté extracellulaire, ce récepteur possède quatre domaines immunoglobuline et six motifs fibronectine de type III. Le domaine cytoplasmique de DCC comporte trois régions, P1, P2 et P3 impliquées dans les signalisations [269]. Son domaine de mort est également connu, et se situe en amont du site de clivage par la caspase 3.

La nétrine-1 se lie via ses domaines V et VI aux quatrième et cinquième domaines fibronectine de type III de DCC [270] [271].

Chez l'Homme, l'expression de DCC est détectée dans différents tissus au cours du développement et chez l'adulte. Ainsi, au cours du développement, l'expression de DCC est observée dans diverses régions du cerveau, mais également dans l'épithélium de nombreux tissus tels que le tractus digestif, la peau, le poumon, la vessie ou la prostate [272]. Les souris invalidées pour DCC meurent de manière périnatale, et présentent des défauts de projection axonale et du système nerveux [239] (**Tableau 10**). Chez l'adulte, DCC est faiblement exprimé mais de manière relativement ubiquitaire.

1.3.3.1.3 UNC5H

Les récepteurs UNC5H, qui regroupent chez l'homme UNC5A, B, C et D, correspondent à des récepteurs transmembranaires de type I d'environ 110 kDa. Ils sont constitués de deux domaines immunoglobuline, et de deux domaines thrombospondine de type I au niveau de leur partie extracellulaire. Coté intracellulaire, les récepteurs sont composés d'au moins trois domaines conservés :

- (i) Le domaine ZU-5 (Zona-occludens/Unc-5 homology domain),
- (ii) Le domaine UPA (Unc-Pidd-Ankyrins) commun aux protéines UNC5, PIDD et Ankyrin et contenant une séquence d'interaction avec le domaine P3 de DCC appelée DB (DCC Binding)
- (iii) Un domaine de mort DD (Death Domain) en C-terminal, homologue à celui des récepteurs de mort classiques de la famille du TNF.

La nétrine-1 se lie via ses domaines V et C aux deux domaines immunoglobuline de la partie extracellulaire des récepteurs UNC5H [270] [271] [273].

Le profil d'expression des récepteurs UNC5H est intrinsèquement lié à leur rôle dans le développement du système nerveux central et périphérique mettant en jeu la nétrine-1. Ainsi, au cours du développement, UNC5A et B sont exprimés au niveau de la moelle épinière, mais également au niveau de la rétine dorsale et le cervelet, avec UNC5C [274]. UNC5D est principalement exprimé dans le cortex somatosensoriel et les aires visuelles [275]. En dehors du système nerveux, les gènes *UNC5B*, *C* et *D* sont exprimés dans divers organes en développement, tels que le poumon, le bourgeon de membre, l'oeil ou le système vasculaire. Enfin, UNC5B est exprimé au niveau des sites de vascularisation. A l'exception d'UNC5C, l'inactivation des récepteurs UNC5A, B et D induit une létalité embryonnaire. Les mutants pour UNC5C présente néanmoins des malformations ainsi qu'une ataxie. (**Tableau 10**).

Chez l'adulte, les récepteurs UNC5H présentent une expression assez ubiquitaire [276].

1.3.3.2 Une signalisation positive ou négative

L'hypothèse actuelle est qu'en présence de nétrine-1, DCC et UNC5H s'oligomérisent, recrutent différentes protéines adaptatrices et transduisent des signaux migratoires, de différenciation et d'inhibition du signal pro-apoptotique.

La transition entre les deux voies de signalisation, positive et négative, induites par les récepteurs à dépendance correspond au passage d'un état multimérique en présence de ligand, à un état monomérique en son absence. Dans ce sens, des travaux ont montré que DCC et UNC5B se multimérisent en présence de nétrine-1, ce qui suffit à bloquer l'apoptose induite par ces récepteurs [277].

L'apoptose induite par DCC et UNC5H en absence de nétrine-1 est peu définie. Des hypothèses proposent que l'absence de ligand entraîne une modification de la structure du domaine intracellulaire du récepteur, permettant le recrutement d'une caspase qui va cliver ce domaine intracellulaire, permettant l'exposition d'un domaine pro-apoptotique appelé ADD (addiction dependence domain) [237].

Pour DCC, l'exposition d'ADD en absence de ligand permet le recrutement d'un complexe d'activation des caspases. DCC recrute et active ainsi la caspase 9, permettant alors l'activation de la caspase 3 indépendamment des voies classiques d'apoptose. Une mutation ponctuelle du site de clivage supprime l'effet pro-apoptotique de DCC, suggérant que le récepteur doit être clivé pour induire l'apoptose.

Pour UNC5H, le clivage par les caspases du récepteur induit le relargage d'un fragment cytosolique contenant un domaine de mort. Ce dernier, pourrait alors activer les protéines pro-apoptotiques DAPK1 et NRAGE, induisant ainsi l'apoptose en absence de nétrine-1 [276, 273] [278].

De plus, une autre étude confirme qu'en absence de ligand, UNC5B adopte une forme monomérique, ce qui entraîne un changement de conformation intracellulaire du récepteur aboutissant au démasquage d'un domaine de mort (Death Domain), permettant ainsi le recrutement de partenaires pro-apoptotiques [273].

Durant ma thèse, je me suis concentrée tout particulièrement sur la voie pro-apoptotique induite par le récepteur UNC5B.

1.3.3.3 La voie apoptotique du récepteur à dépendance UNC5B

La voie pro-apoptotique d'UNC5B, en absence de nétrine-1, fait intervenir DAPK1 (Death Associated Protein Kinase). De par son activité sérine-thréonine kinase, cette protéine intracellulaire est impliquée dans l'induction de mort cellulaire en réponse à un assez grand nombre de signaux apoptotiques [279].

DAPK1 interagit avec UNC5B de manière constitutive via leurs domaines de mort (DD) respectifs, et est capable de s'autophosphoryler pour se maintenir à l'état inactif, par exemple en présence de nétrine-1.

En condition anti-apoptotique (en présence du ligand nétrine-1), UNC5B est homodimérisé et adopte une conformation intracytoplasmique « fermée », avec une interaction du domaine ZU-5 avec les domaines UPA et DD. DAPK1 interagit alors avec le DD d'UNC5B, et la phosphorylation qui permet le maintien à l'état inactif de DAPK1 est assurée par la protéine CIP2A (Cancerous Inhibitor of PP2A), qui permet également d'empêcher le recrutement de protéines susceptibles d'activer DAPK1 par déphosphorylation, telles que PP2A (Protein Phosphatase 2A) [278] [280].

En absence de nétrine-1, la partie intracellulaire d'UNC5B monomérisé est modifiée, et démasque le DD, ce qui permet la libération de CIP2A hors de la zone. PP2A et PR65 β n'étant plus bloqués par la présence de PP2A sont alors recrutés sur le site, et vont activer DAPK1 par déphosphorylation. La DAPK active, activerait et/ou recruterait à son tour d'autres partenaires pro-apoptotiques potentiels, conduisant à l'activation des caspases effectrices qui à leur tour viendraient amplifier le phénomène de clivage des récepteurs [273] [280] [281] (**Figure 30**).

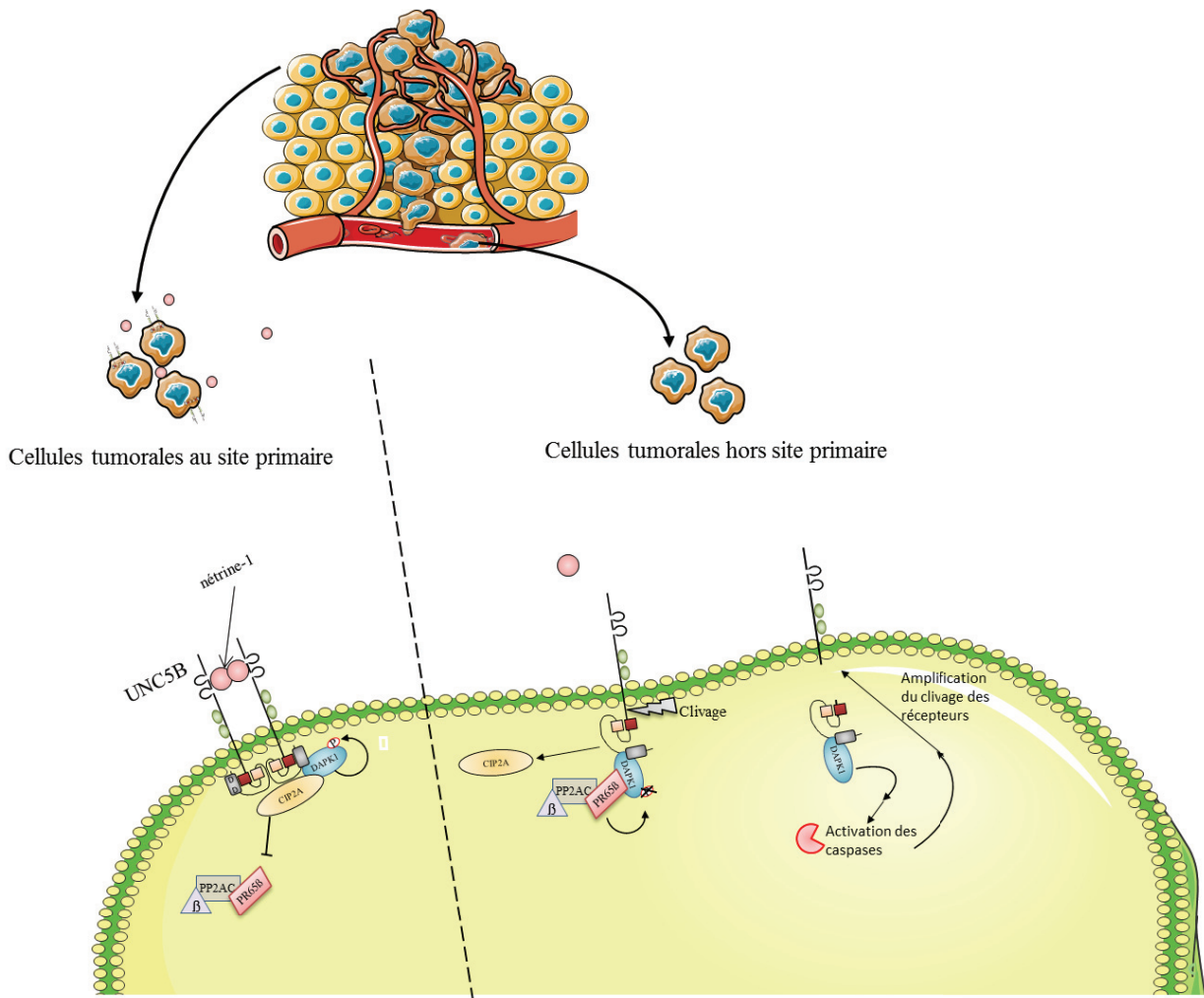


Figure 30 : La voie pro-apoptotique d'UNC5B. En présence de nétrine-1, les récepteurs sont dimérisés et ont une conformation intracellulaire « fermée », permettant l'interaction de DAPK1 et CIP2A, et bloquant le recrutement du complexe PP2AC, PR65 β et de la sous unité β . Ainsi, DAPK1 demeure inactif par phosphorylation. Lorsque la nétrine-1 n'est plus présente dans le micro-environnement, par exemple lorsque les cellules tumorales subissent une extravasation vers les vaisseaux sanguins pour aller disséminer d'autres tissus, le récepteur est sous forme de monomère. Le domaine intracellulaire va alors changer de conformation, permettant de démasquer un domaine de mort, et il va également être clivé. Le changement de conformation entraîne la délocalisation de CIP2A au niveau du complexe intracellulaire, ce qui va avoir pour conséquence le recrutement du complexe PP2AC, PR65 β et de la sous unité β . Ce complexe va alors déphosphoryler DAPK1, ce qui va l'activer et ainsi permettre l'activation des caspases. Les caspases vont alors induire une boucle positive d'amplification du clivage des récepteurs, ce qui va amplifier le signal.

1.3.3.4 Régulation de la voie des récepteurs à dépendance UNC5B

Peu de choses sont connues sur la régulation des voies des RD. Néanmoins, il a été montré UNC5H2, l'homologue d'UNC5B chez la souris, est une cible transcriptionnelle de p53, responsable de son activité pro-apoptotique [282]. Le modèle alors proposé fut le suivant : lorsque la cellule est saine, p53 active l'expression d'UNC5H2 et de la nétrine-1, assurant ainsi la survie cellulaire [283]. De plus, la présence de nétrine-1 sur les récepteurs UNC5B dimérisés va favoriser l'activation de la signalisation PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase)/ Akt (ou Protein Kinase B, PKB), qui va alors phosphoryler PIKE-A au niveau de son résidu Sérine 472. Cette phosphorylation permet d'augmenter l'affinité de PIKE-A (PIKE-activating Akt), un isoforme de PIKE GTPase qui augmente l'activité de PI3K pour le récepteur UNC5B, ce qui va empêcher le clivage intracellulaire du récepteur, et par conséquent inhiber l'induction d'apoptose. PIKE-A augmente également l'activité kinase d'Akt, ce qui induit une dégradation de p53 via MDM2, entraînant alors une suppression de la transcription d'UNC5B via p53 [284, 285] (**Figure 31**).

A l'inverse, lorsque l'ADN cellulaire est endommagé, p53 active l'expression d'UNC5B mais pas celle de la nétrine-1, induisant ainsi l'apoptose par l'intermédiaire du d'UNC5B, via le mécanisme d'apoptose décrit plus tôt dans cette partie [283, 276] [286] [229].

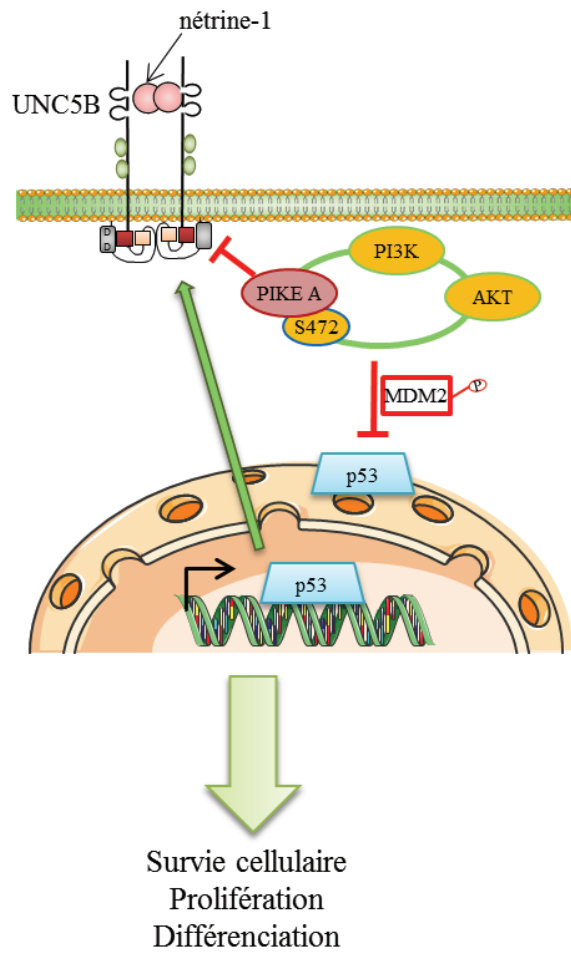


Figure 31 : Régulation p53 dépendante de la voie apoptotique d'UNC5B en présence de nétrine-1.

Cellule cancéreuse

Cellule normale

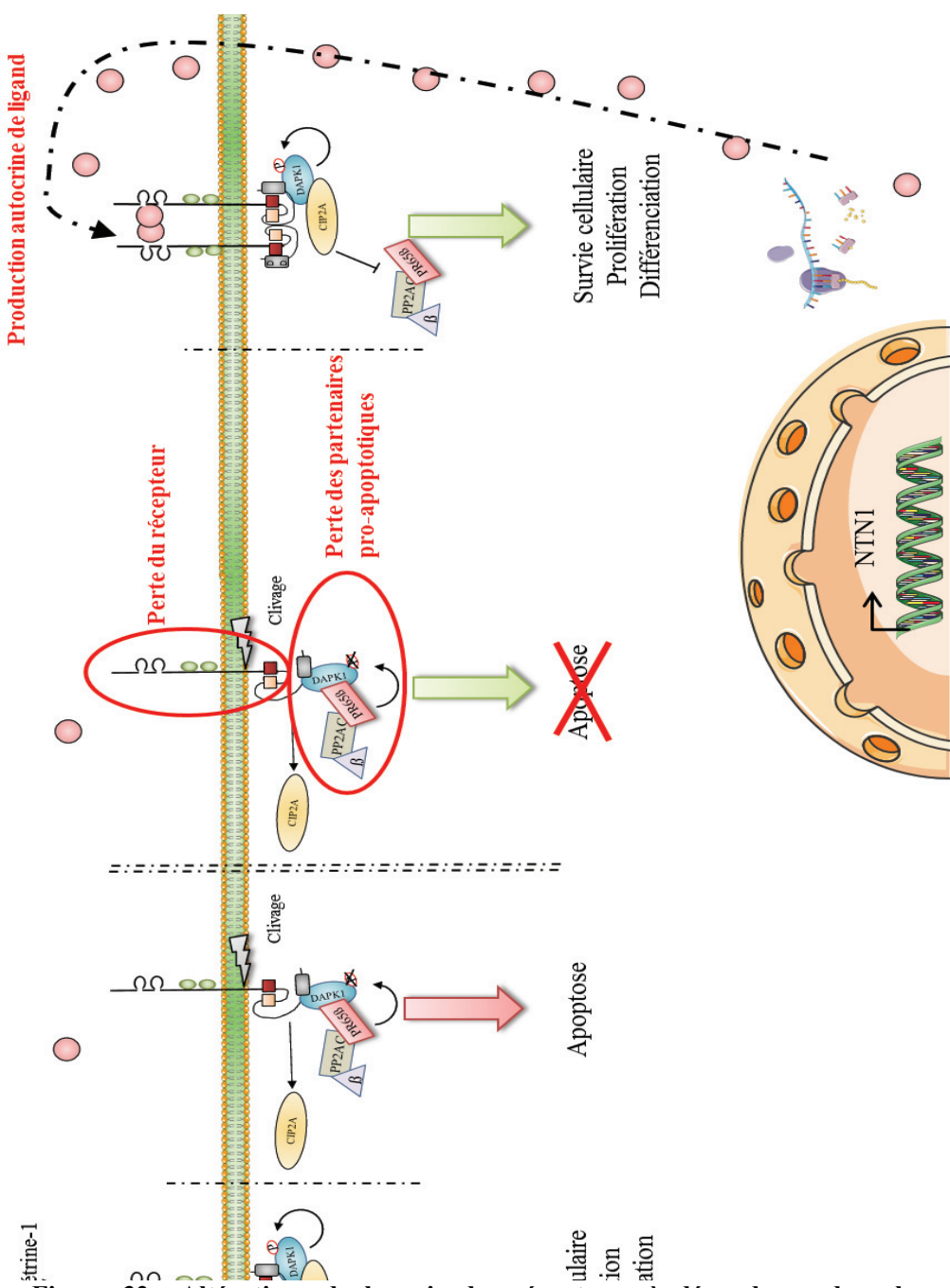


Figure 32 : Altérations de la voie des récepteurs à dépendance dans les cancers. Les tumeurs humaines présentent de fréquentes altérations de cette voie : perte d'expression du récepteur, de ses partenaires pro-apoptotiques ou production autocrine du ligand. Ces altérations ont toutes pour conséquence une perte d'induction d'apoptose par cette voie.

1.3.4 Voie Nétrine-1/ UNC5B, régulation et dérégulations dans les cancers

1.3.4.1 Hypothèse de l'implication des RD dans les cancers et altérations

La signalisation apoptotique d'UNC5B intervient, nous l'avons vu, dans le contrôle du développement embryonnaire, mais également de l'échappement tumoral chez l'homme. En effet, la double signalisation induite par les récepteurs à dépendance pourrait également constituer un mécanisme de surveillance visant à éliminer les cellules proliférant ou migrant de manière aberrante et se trouvant alors en quantité limitante de ligand. Ainsi, le concept des récepteurs à dépendance, et leur pouvoir de vie ou de mort sur la cellule, permet d'envisager leur rôle dans le maintien de l'homéostasie tissulaire et dans la surveillance antitumorale. Comme tout mécanisme de sauvegarde, le contournement de l'apoptose induite par ces récepteurs à dépendance constituera alors un avantage sélectif pour les cellules tumorales. Ainsi, il n'est pas étonnant d'observer des altérations des différents acteurs de cette voie dans les cancers.

La perte de signalisation pro-apoptotique de la voie des récepteurs à dépendance pourrait conférer un avantage sélectif aux cellules tumorales; cette perte peut être mise en place par perte de fonction des récepteurs, altération des partenaires pro-apoptotiques ou alors par production autocrine de ligand (**Figure 32**)

1.3.4.2 Surexpression de la nétrine-1

La production autocrine de nétrine-1 devrait assurer aux cellules la présence permanente du ligand, ce qui leur conférerait un avantage sélectif. Afin de démontrer cette hypothèse, Mazelin et coll. ont créé des souris transgéniques exprimant constitutivement de la nétrine-1 dans l'intestin. Chez ces souris, l'expression uniforme de la nétrine-1 le long de l'épithélium intestinal est associée à une diminution de 50% d'apoptose ainsi qu'à un avantage de progression tumorale. La nétrine-1 joue donc un rôle dans le maintien, l'intégrité, la migration et le renouvellement de l'épithélium intestinal en induisant la survie cellulaire des progéniteurs en cours de prolifération

situés dans les cryptes, au niveau desquelles le taux de nétrine-1 est élevé. Sur le sommet des villis, le taux de nétrine-1 étant faible et les récepteurs à dépendance DCC et UNC5H étant exprimés uniformément dans l'intestin, ils exercent une activité pro-apoptotique [238]. La nétrine-1 est exprimée dans certains sites primaires de tumorigénèse, comme les cryptes intestinales, les tissus mammaires pulmonaires ou colorectaux, mais n'est pas détectée dans le sang [287-289]. Elle est cependant détectée dans certains sites métastatiques tels que le foie, les os, le cerveau ou les poumons [290] [291]. L'hypothèse formulée à ce propos est que les RD spécifiques de la nétrine-1 réguleraient le développement métastatique en assurant la dépendance cellulaire à la disponibilité du ligand, et induisant ainsi potentiellement l'apoptose par défaut de présence du ligand lors de l'intravasation de cellules tumorales (Figure 29) [229].

Mais la nétrine-1 n'est pas toujours augmentée dans les cancers ; son expression a en effet été montrée comme diminuée dans les tumeurs du cerveau, de la prostate et les neuroblastomes [268, 292], ou alors on peut également voir les choses sous un autre angle ; en effet, la nétrine-1 a été montrée par exemple surexprimée dans environ 47% des cancers du poumons non à petites cellules et dans 31,5% dans cancers mammaires impliquant une invasion ganglionnaire [290] [288]. Cela implique également une absence d'augmentation voire une perte d'expression dans 53% et 68.5% des cas, respectivement.

Pour expliquer comment les cellules tumorales contournent l'apoptose en absence de nétrine-1, l'hypothèse formulée est que la voie pro-apoptotique des récepteurs à dépendance est altérée, par la perte d'expression du récepteur et/ ou de ses partenaires pro-apoptotiques [229].

1.3.4.3 Perte des récepteurs

L'inhibition de la mort induite par ces récepteurs, via l'expression constitutive de nétrine-1 dans l'intestin de souris est associée à la progression tumorale [238]. De plus, l'expression des récepteurs UNC5H, dont UNC5B est fortement réduite dans un grand nombre de cancers humains comme à 93% dans les cancers colorectaux (notamment par perte d'hétérozygotie), 88% dans les tumeurs ovariennes, 81% dans les tumeurs rénales, 74% dans les cancers des poumons et à 68% dans les cancers de l'estomac [276, 282].

Dans des tumeurs gastriques, cette perte d'expression est associée à l'hyperméthylation du promoteur d'*UNC5B* ainsi qu'à des marques répressives d'histones H3K27me3, suggérant l'implication de mécanismes épigénétiques dans l'inhibition transcriptionnelle de ce gène [293].

1.3.4.4 Perte des partenaires pro-apoptotiques

1.3.4.4.1 DAPK1

DAPK1 est un gène impliqué dans un grand nombre de voies de signalisation cellulaires, dont la migration, ainsi qu'un grand nombre de voies de morts cellulaires (apoptose, anoikis, nécrose etc.... En ce sens, *DAPK1* est globalement admis comme étant un gène impliqué dans la surveillance métastatique [294-296]. L'expression de la protéine kinase DAPK, est également dérégulée dans de très nombreux types de cancers, principalement par hyperméthylation de son promoteur, mais l'on peut également observer des délétions, mutations ponctuelles au sein de la région promotrice mais aussi des modifications post-traductionnelles, notamment par phosphorylation. Ces modifications abolissent l'activité de la DAPK, et sont corrélées à une augmentation de la survie des cellules tumorales et de leur agressivité [294] [278]. Par exemple, une régulation négative de l'expression de DAPK est observée dans les cancers du poumon, et est corrélée avec le stade avancé de la maladie et l'invasion des ganglions lymphatiques. Dans les cancers papillaires de la thyroïde, l'hyperméthylation du promoteur de DAPK1 associée avec plusieurs marqueurs d'agressivité, notamment l'invasion ganglionnaire et les métastases. Il en est de même dans les carcinomes gastriques, de la tête et du cou. En outre, dans les tumeurs hypophysaires, des carcinomes des voies urinaires et le carcinome hépatocellulaire, la perte de *DAPK1* est associée à une tumeur de stade avancé et de phénotypes agressifs. Dans les métastases cérébrales dérivées de diverses tumeurs solides, l'inactivation de l'expression DAPK1 semble être un évènement fréquent... [296]. Collectivement, ces données confirment que DAPK possède des fonctions de suppressives de métastase, et que ce gène est fréquemment perdu dans les cancers, en particulier par hyperméthylation de son promoteur.

1.3.4.4.2 CIP2A et PP2A

CIP2A est un oncogène dont la fonction cellulaire est d'inhiber PP2A, bloquant ainsi la mort cellulaire. Il existe également une boucle de contrôle positive entre CIP2A et MYC, qui

augmente l'activité de MYC dans les cellules tumorales. Ce dernier voit son expression augmentée dans différents cancers comme par exemple 40% des cancers du sein en général, 64% des tumeurs de type triple négatives et 79% des métastatiques, mais également dans les tumeurs gastriques [297].

L'activation de la DAPK en aval d'UNC5B est médiée par la protéine phosphatase PP2A (Protein Phosphatase 2A), capable de former différents complexes. Ces enzymes sont hétérotrimériques, et composées d'une sous unité échafaudage (PR65 α ou β), d'une sous unité catalytique associée à une sous unité régulatrice. Cette protéine est connue pour son activité suppresseur de tumeur, et est dérégulée dans de nombreux cancers, notamment le poumon, le sein, la peau et le colon [280, 298].

1.3.4.4.3 TP53

Comme vu précédemment, il a été montré qu'UNC5B est une cible transcriptionnelle de p53 responsable de son activité pro-apoptotique. Ce gène est muté dans plus de 50% des cancers chez l'homme. Cet incontournable de la cancérologie, ou gardien de l'intégrité du génome participe également, nous l'avons vu plus tôt, à l'apoptose induite par UNC5B en absence de ligand [299, 300]. Les très nombreuses altérations de ce gène décrites dans les cancers pourraient donc participer à la perte fonctionnelle de la voie apoptotique d'UNC5B en absence de nétrine-1 dans le développement tumoral et les métastases.

1.3.5 **Conclusion: le ciblage de la nétrine-1 dans les cancers, une stratégie thérapeutique suffisante?**

Compte-tenu de leur fonctionnement bimodal, une stratégie thérapeutique basée sur la restauration de l'apoptose induite par les récepteurs à dépendance a été imaginée au laboratoire **dans le cas de cancers associés à une surexpression de nétrine-1**. Dans le cas d'une perte de la fonction apoptotique du récepteur à dépendance, la conception de thérapies rétablissant cette fonction pro-apoptotique est délicate. En revanche, l'utilisation de composés capables d'interférer dans la liaison du ligand à son récepteur devrait posséder un effet anti-tumoral, en déclenchant l'apoptose des cellules cancéreuses.

En ce sens, des travaux antérieurs à mon arrivée au laboratoire ont montré que l'inhibition de la liaison de la nétrine-1 à ses récepteurs DCC et UNC5H avait une action antitumorale, basée sur la restauration de l'apoptose induite par les récepteurs à dépendance. La preuve de concept de cette stratégie a été établie à l'aide du peptide DCC-5Fbn, correspondant au 5ème domaine Fibronectine (Fbn) de DCC, connu pour interagir avec la nétrine-1 [290, 301, 288, 289]. Durant ma thèse, différentes générations d'anticorps bloquant cette même interaction récepteur ligand ont vu le jour ; j'ai travaillé sur l'ensemble de ces molécules et présenterai des résultats sur les deux dernières générations d'anticorps ; la première n'ayant pas été sélectionnée pour des études cliniques et la deuxième fera l'objet d'une étude clinique qui débutera début 2016.

Le problème de ce ciblage unique est que l'on part du principe selon lequel la voie pro-apoptotique des récepteurs est intacte et fonctionnelle. Or, on l'a vu plus tôt, il existe des altérations de cette voie dans les tumeurs, et leur conséquence est une perte d'induction d'apoptose, même en absence de nétrine-1. Cela implique donc théoriquement que même si l'on bloque l'interaction entre le ligand et le récepteur, le signal pro-apoptotique ne sera pas acheminé jusqu'à l'activation des caspases effectrices, ce même si la nétrine-1 est surexprimée.

De plus, les altérations de type génétiques (mutations, délétions) sont délicates en termes de thérapie. Nous avons vu dans la partie 2 de cette introduction que des altérations épigénétiques étaient généralement observées dans les cancers humains, et touchent notamment la voie des récepteurs à dépendance. Par exemple, UNC5B est perdu dans les cancers gastriques par hyperméthylation de l'ADN, et il en est de même pour DAPK1, notamment dans les tumeurs pulmonaires et mammaires.

Les altérations épigénétiques ont la formidable caractéristique d'être réversibles, et il existe différentes drogues capables de modifier les structures épigénétiques de l'ADN, et de réactiver certaines voies, notamment dans les cellules cancéreuses.

L'objectif de mon travail de thèse fut de vérifier l'implication de la méthylation dans la répression transcriptionnelle de la voie des récepteurs à dépendance, puis de mettre au point des modèles précliniques visant à réactiver à l'aide d'inhibiteurs de DNMT1 l'expression de gènes cibles hyperméthylés, et ainsi de resensibiliser les cellules tumorales à l'apoptose induite par les anticorps bloquant l'interaction ligand/ récepteur (Figure 33).

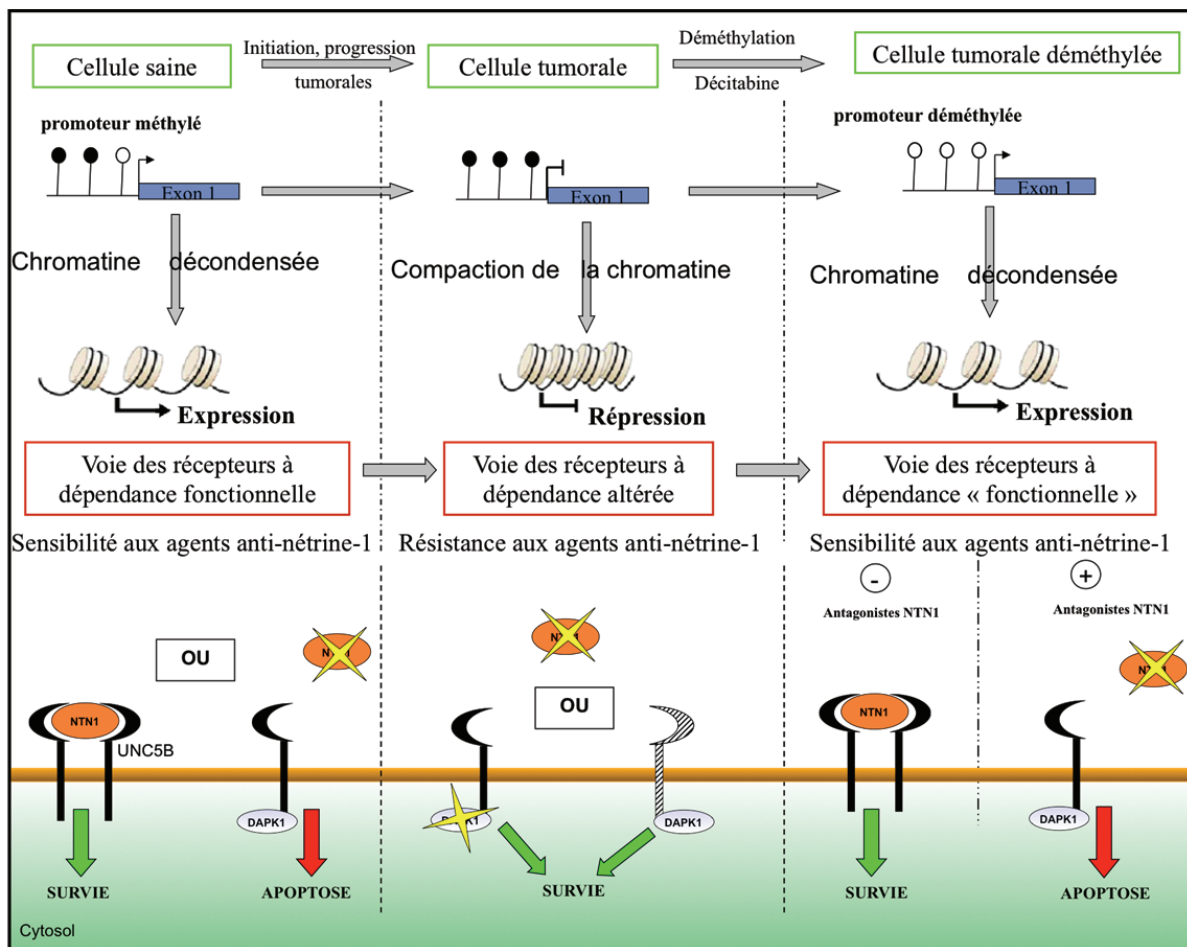


Figure 33 : Problématique de mes travaux de thèse. Dans des cellules normales, les gènes impliqués dans la voie des récepteurs à dépendance sont exprimés. Ainsi, en présence de ligand dans le micro-environnement tumoral, le récepteur UNC5B va interagir avec différentes protéines intracellulaires qui vont favoriser la survie cellulaire, la prolifération etc... tandis qu'en absence de ligand, le récepteur va induire l'apoptose via l'activation de son partenaire pro-apoptotique majeur : DAPK1.

Dans les cellules tumorales, on observe de fréquentes altérations de la voie des récepteurs à dépendance UNC5B, avec notamment une hyperméthylation des gènes impliqués dans cette voie, menant à une répression transcriptionnelle de ces gènes. Ce phénomène a pour conséquence la perte de la voie apoptotique d'UNC5B en absence de ligand nétrine-1.

Nous avons émis l'hypothèse selon laquelle l'utilisation d'inhibiteurs de DNMT1 comme la décitabine pourrait induire une perte de méthylation de l'ADN, notamment au niveau des gènes méthylés de cette voie, ce qui permettrait de resensibiliser les cellules tumorales au blocage de l'interaction ligand/récepteur, et donc permettrait de tuer les cellules tumorales.

2 RESULTATS

L'ensemble des travaux effectués durant ma thèse sont regroupés en deux manuscrits principaux ; en effet, les travaux concernant l'étude de la méthylation et du potentiel thérapeutique basé sur la réactivation de la voie pro-apoptotique des récepteurs à dépendance pour son ciblage via des anticorps bloquant l'interaction nétrine-1/ UNC5B ont été effectués sur des modèles de cancers des poumons non à petites cellules, et des cancers mammaires.

Ces travaux font actuellement l'objet d'une demande de brevet

Mes travaux portant sur les NSCLC sont regroupés dans un premier manuscrit, envoyé à Cancer Cell en février de l'année 2014, et en révisions depuis. Au mois de juillet dernier, nous avons reçu des révisions favorables pour ce manuscrit, auxquelles nous avons répondu fin aout. Nous sommes donc actuellement en attente de commentaires concernant le quatrième tour de révisions.

Les données obtenues sur les modèles mammaires font l'objet d'un manuscrit envoyé à EMBO Molecular Medicine, en review actuellement.

J'ai également effectué durant ma thèse un certain nombre de travaux dont je résumerai l'essentiel dans une troisième partie dédiée.

Enfin, j'ai durant ma thèse participé activement à l'étude faite par Guillaume Devailly sur la dynamique de la fixation de MBD2 sur les régions méthylées de l'ADN durant la transformation maligne de cellules épithéliales mammaires humaines. Ces travaux seront donc présentés dans une annexe dédiée.

2.1 Papier N°1 : Décodage structurel de l'interaction nétrine-1/ UNC5B et implications thérapeutiques dans les cancers.

Mélodie Grandin, Markus Meier, Jean Guy Delcros, Denise Nikodemus, Raphael Reuten, Trushar R. Patel, David Goldschneider, George Orriss, Natalie Krahn, Amina Boussouar, Riad Abes, Yann Dean, David Neves, Agnes Bernet, Stephane Depil, Fiona Schneiders, Kate Poole, Robert Dante, Manuel Koch, Patrick Mehlen and Jörg Stetefeld.

2.1.1 Préambule

Ce manuscrit est la conséquence d'une collaboration avec le laboratoire de biologie structurale Jörg Stetefeld, de l'université de Manitoba au Canada et de Manuel Koch, de l'institut de biochimie de l'université de Cologne, en Allemagne, l'équipe de Patrick Mehlen et de Netris Pharma.

Ces derniers ont permis de déterminer avec précision les domaines de nétrine-1 et d'UNC5B responsables de l'interaction ligand/récepteur. Ils ont également permis d'établir la qualité du blocage de cette interaction par l'anticorps anti-nétrine-1 (NET1-mAb) développé dans notre laboratoire. Cette démonstration permet d'émettre l'hypothèse d'un effet antitumoral de cet anticorps dans des modèles cellulaires et précliniques. Cette hypothèse a été validée que plusieurs modèles cellulaires, en monothérapie.

Dans ce contexte, j'ai travaillé sur les NSCLC. L'étude des cohortes TCGA m'a permis de démontrer que dans la plupart des tumeurs pulmonaires, l'expression de *DAPK1* est perdue via l'hyperméthylation de son promoteur. De plus, l'expression de *NTN1* n'est pas augmentée dans la majorité des tumeurs. Cela implique de potentielles résistances aux NET1-mAb dans les tumeurs pulmonaires. A l'aide de traitement avec des inhibiteurs de DNMT1, tels que la décitabine, nous avons pu vérifier d'une part l'hypométhylation et la réactivation de *DAPK1* et *NTN1* dans une lignée naturellement résistante au NET1-mAb, mais également validé la resensibilisation des cellules tumorales aux antagonistes de la nétrine-1 par combinaison des deux molécules, à la fois

in vitro et *in vivo*. La spécificité du mécanisme a également été validée *in vitro* par des invalidations des gènes *DAPK1*, *UNC5B* et *NTN1*.

Ainsi, l'ensemble de ces résultats posent la trame de départ, nous l'espérons, du développement préclinique d'un nouvel anticorps thérapeutique en thérapie anticancéreuse. Les premiers essais cliniques de NET1-mAb sont prévus pour début 2016.

Structural decoding of the Netrin-1-UNC5 interaction and its therapeutical implications in cancers

Mérodie Grandin^{a#}, Markus Meier^{b#}, Jean Guy Delcros^{a#}, Denise Nikodemus^{d#}, Raphael Reuten^{d#}, Trushar R. Patel^{b,e}, David Goldschneider^a, George Orriss^b, Natalie Krahn^b, Amina Boussouar^a, Riad Abes^c, Yann Dean^c, David Neves^c, Agnes Bernet^{ac}, Stephane Depil^c, Fiona Schneiders^d, Kate Poole^f, Robert Dante^{*a}, Manuel Koch^{*d}, Patrick Mehlen^{*a} and Jörg Stetefeld^{*b}.

^a*Apoptosis, Cancer and Development Laboratory, Equipe labellisée 'La Ligue', LabEx DEVweCAN, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, INSERM U1052-CNRS UMR5286, Université de Lyon, Centre Léon Bérard, 69008 Lyon, France.*

^b*Department of Chemistry, ^e Microbiology and ^f Biochemistry and Medical Genetics, University of Manitoba, 144 Dysart Road, Winnipeg, Manitoba RT3 2N2, Canada*

^c*Netris Pharma, Centre Léon Bérard, 69008 Lyon, France.*

^d*Centre for Ecology, Evolution and Environmental Changes, Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, Lisbon, Portugal, Institute for Dental Research and Oral Musculoskeletal Research, and Center for Biochemistry, University of Cologne, 50931 Cologne, Germany*

^e *Current address:*

School of Biosciences, University of Birmingham, Birmingham, B152TT, United Kingdom

^f *Department of Neuroscience, Max-Delbrück Center for Molecular Medicine, Robert-Rössle Straße 10, D-13092 Berlin, Germany.*

shared first authors

*Corresponding authors:

Patrick Mehlen (patrick.mehlen@lyon.unicancer.fr)

Robert Dante (robert.dante@lyon.unicancer.fr)

Manuel Koch (Manuel.Koch@uni-koeln.de)

Jörg Stetefeld (jorg.stetefeld@ad.manitoba.ca)

JGD, RA, YD, DN, AB, SD and PM declare to have conflict of interest as respectively employees (RA, YD, DN, AB, SD), consultant (JGD) and shareholders (AB, PM) of Netris Pharma.

Summary

Netrin-1 has been shown to be up-regulated in a fraction of human cancers as a selective mechanism that allows the inhibition of the pro-apoptotic activity of some of its main receptors, the UNC5-homologs (UNC5H). Here we describe that the netrin-1-V-2 domain is implicated in the interaction with the Ig1/Ig2 domains of UNC5H2 and report the generation of a monoclonal humanized anti-netrin-1 antibody that disrupts this interaction with nanomolar affinity, triggers netrin-1 expressing tumor cell death in vitro. We also present evidence that combining the anti-netrin-1 antibody with epidrugs such as decitabine could also be efficient in tumors showing no or modest netrin-1 expression. By reason of these properties, we portray this antibody as a promising drug candidate.

Significance

Netrin-1, initially described as an axon guidance cue during embryonic development, appears to be up-regulated in a large fraction of human cancers to block the pro-apoptotic activity of some of its main receptors, the UNC5-homologs (UNC5H). We report here the identification of the first therapeutic antibody targeting netrin-1 and disrupting netrin-1/UNC5H2 interaction. We also show pharmacology data supporting the view that this antibody may represent a promising tumor growth inhibiting drug either used in monotherapy in patients bearing netrin-1 expressing tumor or in combination with epidrugs in patients with tumors that have epigenetically silenced netrin-1 and the UNC5H2 death effector DAPK.

Introduction

Netrin-1 has been described in the early 1990's as a secreted chemotropic cue that guides commissural axons toward the basal structure of the spinal cord [302]. Since then, this protein has been shown to perform multiple determinant functions both during embryonic development and in adults. Netrin-1 plays key roles in neuronal navigation, immune cell migration, angiogenesis, and cell survival [266, 303]. As a consequence, netrin-1 has been implicated in multiple diseases, including diabetes, cardiovascular diseases and cancer [303-306].

Netrin-1 is a member of the family of secreted netrins, which consists of netrin-1, netrin-3, and netrin-4 in humans. The molecule of approximate 600 residues is composed of an N-terminal domain VI, followed by three laminin-type epidermal growth factor (LE) repeats (V-1, V-2 and V-3) and a positively charged C-terminal domain (domain C).

Most of netrin-1 activity has been shown to occur through the regulation of the signaling pathways induced by its main receptors Deleted in Colorectal Carcinoma (DCC) and UNC5-homolog (UNC5H, i.e. UNC5A, UNC5B, UNC5C, UNC5D or UNC5H1-H4) [274]. The current view of the signal transduction regulated by netrin-1 is that upon ligand binding to DCC and/or UNC5H, these receptors transduce "positive" signals leading to activation of proteins such as MAPK [307] or PI3K [308], whereas upon netrin-1 withdrawal unbound receptors actively trigger apoptosis [237, 240, 278]. These receptors thus belong to the growing family of dependence receptors [309] (Gibert and Mehlen, 2015). DCC and UNC5Hs are both single-pass transmembrane receptors of the Ig superfamily [310, 311]. Current structural knowledge is limited to complexes of netrin-1 with DCC and its homolog neogenin (NEO1) [312, 313]. Much less is known about the netrin-1-UNC5H complex formation. Indeed, only the Ig1-2 tandem repeat of UNC5H2 has been shown to be involved in netrin-1 binding [270].

This lack of information regarding the UNC5H interaction with netrin-1 is somewhat paradoxical when taken into account the patho-physiological relevance of this interaction. For

example, recent data have shown that in obesity-driven diabetes, netrin-1 is implicated in insulin-resistance [306]. Similarly, netrin-1 has been shown to be up-regulated in cancers as a selective advantage that permits the inhibition of the apoptosis which is normally induced by the dependence receptors UNC5Hs [288, 289, 303]. Several animal proof-of-concept studies have shown that recombinant portions of netrin-1 receptors ectodomains either used alone or in combination with conventional chemotherapies slow tumor growth and inhibit metastasis [290, 286]. In a substantial part of human cancers, netrin-1 receptors and their pro-apoptotic effectors are epigenetically silenced, and thus potentially resistant to netrin-1 neutralizing agents. Nevertheless, the partial reversibility of the epigenetic alterations offers an opportunity to overcome this resistance, upon epidrug treatments.

Results

Netrin-1 interacts with UNC5H2 via its laminin V-2 sub-domain

We determined the crystal structure of (**Figure 1 and S1**) by multiple isomorphous dispersion (MAD) using Ta₆Br₁₂ as a heavy atom derivative (**Supplementary Table 1**). Combined with anomalous dispersion from sulfur atoms (**Supplementary Table 2**) we confirmed the amino acid register of netrin-1 and localized individual disulfide bridges and the structural calcium (**Figure S1**).

The structure of netrin-1 reveals a head to stalk arrangement with a length of 150 Å in which the globular shaped N-terminal domain VI forms the head and the three rod-like consecutive LE domains make up the stalk (**Figure 1A**). Domain VI forms a β-sandwich jelly-roll motif with a front face composed of sheet S5-S2-S7 and a dorsal face composed of sheet S4-S3-S6-S1. The topology of this domain is similar to the N-terminal domain in laminin short arms and Netrin G proteins [314, 315, 312, 313] (**Figure S1**). There is clear electron density for glycan additions at three asparagine-linked glycosylation sites, Asn95, Asn116, and Asn131 (**Figure 1B**). A calcium binding site is situated at the sugar-binding edge of the β-sandwich encompassing asparagine residues 95 and 116. This structural calcium resides in a hidden cleft at the helical segment connecting the rim-sheet to β-strand S1 and is fixed by seven ligands (**Figure 1C**). Each of the three V subdomains adopts the classical LE-fold consisting of irregular coil segments and form a linear extended structure [316]. They are lacking a hydrophobic core, show few secondary structural elements and are stabilized by a characteristic pattern of conserved disulfide bridges. The most striking feature, however, is the highly electropositive

nature of the V-2 subdomain. Cluster of arginine and lysine sidechains offer extended recognition sites for acidic ligands (**Figure 1D**).

To identify which domains of netrin-1 contained the UNC5H2 binding epitopes, we generated a series of netrin-1 and laminin- γ 1 short arm chimeras and evaluated their interaction with UNC5H2 (**Figures 2A-C and S2**). We took advantage of the fact that netrin-1 and laminin- γ 1 both share the same modular topology, but do not overlap in their binding specificity [317, 318]. Our results assign the subdomain V-2 of netrin-1 as the key site for binding to UNC5H2 (**Figures 2A-C and S2**). This domain exhibits the highest similarity to the secreted netrin-3 (**Figure S3A**). Overall, the V domains of netrin-1 are most similar to the LE-repeats of the laminin γ 1-subunit, with the exception of V-2 that is more closely related to the V-2 domain of the laminin β 1-subunit [319] (**Figures S3A and S3B**). To identify which amino acid residues mediate the interaction with the full-length ectodomains of UNC5H2, we designed mutants taking into account the three-dimensional structure of V-2 and the phylogenetic conservation degree (**Figure 2A**). To probe the UNC5H2 binding epitope, we swapped loop segments within the V-2 subdomain between netrin-1 and netrin-4. As a result, we observed a 50-fold drop in affinity to UNC5H2 (**Figures 2B and 2C**). Along the same line, we introduced the netrin-1 V-2 domain into laminin γ 1 chain or in netrin-4 and observed an increased affinity to UNC5H2 (**Figures 2D and S4A**). In a subsequent fine screen, we observed an impairment of UNC5H2 binding in the arginine double mutant (R348A-R349A) (**Figures 2B and 2C**). Together, Arg348 and Arg349 form a linear, solvent exposed patch of about 10Å, which is flanked by Arg351 that precedes the helical element of loop *b* (**Figure 2E**).

To decipher the precise UNC5H2 binding epitope for netrin-1, we compared the binding affinity of the full-length ectodomain of UNC5H2 with truncated versions (**Figures 2F-H**). Truncation experiments confirmed that the Ig1-2 tandem alone is sufficient for high-affinity

netrin-1 binding [270], thus demonstrating that the Ig1 domain of UNC5B is the primary interaction domain for netrin-1.

To further show the importance of the R348 RCR351 motif in netrin-1/UNC5H2 interaction, we performed a binding assay in presence of increasing concentration of a ARRSR repeated motif or a AAASR control peptide. As shown in **Figure 3A**, the ARRSR is sufficient to inhibit netrin-1/UNC5H2 interaction. We further explore this interaction in human cells. Recombinant netrin-1 or netrin-1 mutants were added to HEK293 cells which express UNC5H2 and netrin-1 interaction, and cells were analyzed for their netrin-1-dependent cell adhesion (**Figures 3B, 3C and S4B**). In agreement with the in vitro data, netrin-1 lacking domain C can act as a cell adhesion substrate for HEK293 cells but needs the Arg348 and Arg349 to do so (**Figures 3B and S4B**). Interestingly, the adhesion is independent of integrins because addition of Mn^{2+} and Mg^{2+} or EDTA does not change the binding behavior (**Figure 3C**). Together, these data support the view that netrin-1 interacts with UNC5H2 in the V-2 domain.

UNC5H2 was previously reported as able to induce cell death in absence of netrin-1, thus we assessed whether the effect of V-2 modification could affect the ability of netrin-1 to block UNC5H2-induced cell death. To do so, we set up a Hela-sleeping beauty-based cellular model where UNC5H2 is ectopically expressed upon doxycycline treatment (**Figure S5A**). As shown **Figure 3D**, UNC5H2 up-regulation is associated with cell death induction, while addition of recombinant wild-type netrin-1 inhibits UNC5H2-induced apoptosis. In this setting, addition of the R348A-R349A double mutant of netrin-1 fails to block UNC5H2-induced apoptosis. These results support the view that netrin-1 specifically interacts with UNC5H2 via its V-2 domain, and this interaction prevents the pro-apoptotic activity of the receptor.

Identification of an anti-netrin-1 antibody blocking netrin-1/UNC5H2 interaction

In an attempt to generate a drug candidate that may re-trigger cancer cell death by disrupting the netrin-1-UNC5H interaction, we screened for netrin-1-specific antibodies using a medium-throughput screening approach. We used an immunization procedure in a HTP™ mice that allows for dual ELISA assay-screens in extended antibody repertoires. One single IgG1 monoclonal antibody was selected, sequenced and then further optimized/humanized. The antibody (respectively NET1-M-mAb or NET1-H-mAb for murine and humanized antibodies) binds human netrin-1 (but fails to bind netrin-4) with a nanomolar range affinity (**Figures 4A and S5B**). The netrin-1-specific antibody inhibits the -UNC5H2 interaction in vitro with an IC50 of 2nM (**Figure 4B**). To identify the netrin-1 domain interacting with this antibody, we performed Pepscan epitope mapping using a spot array of 590 15-amino acid linear peptides covering the whole sequence of human netrin-1. As shown in **Figure 4C**, the antibody binds 8 overlapping peptides corresponding to the amino acid sequence "ARRCRFNMELYKLSGRKSGGVC" which is present within the V-2 domain of netrin-1 (see **Figure S3A**). The binding epitope of the antibody thus overlaps with the netrin-1 domain involved in the interaction with UNC5H2 (**Figure 4D**). To confirm that the V-2 domain of netrin-1 is indeed responsible for the interaction with NET1-H-mAb, we used a collection of netrin-1 mutants and performed in vitro binding assays. As shown in **Figure 4E**, the point mutation K358L was sufficient to decrease interaction with the NET1-H-mAb. As expected, the triple netrin-1 mutation R348A-R349A-R351A reduced the interaction with UNC5H2, but had no effect on its interaction with NET1-H-mAb.

The NET1-H-mAb efficiently inhibits netrin-1 expressing tumor growth

We next assessed whether the NET1-H-mAb could impede the inhibitory effect of netrin-1 on UNC5H2-induced apoptosis via its capability to block netrin-1-UNC5H2 complex formation. Using the sleeping beauty-based Hela cell system with doxycycline dependent UNC5H2 expression, and in which netrin-1 was stably expressed, we observed that treatment with NET1-H-mAb triggers apoptosis induction (**Figure 5A and S5A**). As shown in **Figure 5B**, addition of

NET1-H-mAb to the netrin-1 expressing SKMEL5 cancer cell culture triggers efficient tumor cell death. Similar types of results were obtained when anchorage-independent growth was measured (**Figure S5C**).

We next assessed the NET1-H-mAb for their eventual anti-cancer effect in mouse models. We intraperitoneally injected mice treated with AOM-DSS twice a week with either an isotypic antibody or NET1-H-mAb. While 66.7% of the AOM-DSS treated control mice developed adenocarcinoma, only 14.3% of NET1-H-mAb-treated mice developed similar aggressive tumors (**Figure 5C**). Finally, using netrin-1 expressing cancer cell lines engrafted in nude mice, we demonstrated that the netrin-1-specific antibodies (both human and mice version) had tumor growth inhibiting effects (**Figure 5D**).

Combining the NET1 mAb with epidrugs as a promising therapeutic option

Some tumors appear to silence the dependence receptor death effector module. Along this line, it has been previously shown that, upon experimental withdrawal of netrin-1, UNC5H2 triggers apoptosis through the activation of its pro-apoptotic partner DAPK1 [280]. In addition, *DAPK1* is downregulated in various cancers, and this loss of expression is correlated with promoter hypermethylation [320]. Thus, we investigated in a human non-small cell lung cancer (NSCLC) cohort (106 paired samples, data from TCGA) the expression of *NTN1* (netrin-1 gene) and *DAPK1* (**Figure 6**). About 78% of the patients exhibited a decrease in *DAPK1* expression and *NTN1* was down-regulated in 27% of the samples analyzed (≥ 2 fold), (**Figures 6A and 6B**). Among the mechanism potentially involved in these transcriptional repressions, DNA methylation seems to play an important role, since we observed that *DAPK1* and *NTN1* were hypermethylated at their 5' end in respectively 33% and 41% of tumors, when compared to the paired normal tissues (**Figures 6C and D**). In addition, significant correlation between gene expression and DNA methylation for the total cohort was observed ($R = -0.302$, $p < 1.10^{-6}$ and $R = -0.205$, $p < 1.10^{-6}$ for *DAPK1* and *NTN1* respectively; Pearson test, threshold p-value = 0.01)

(**Figures 6E and 6F**). We also observed that among the samples where data for both DNA methylation and gene expression were available (TCGA, N= 707), 58.4% of tumors were not up-regulated for *NTN1* (Fold Change Tumor /Normal < 1.3) and exhibited a mean 2.12 fold decrease of *DAPK1* expression and 78% increase of *DAPK1* DNA methylation level in comparison to the median value of normal tissues. These observations support the view that netrin-1 low tumors exhibit frequently a concomitant downregulation of *DAPK1* via promoter methylation. To further investigate the potential epigenetic mechanisms involved in the alterations of this pathway in NSCLC, H460 cells, that were shown to be non-responsive to netrin-1 interference [288], were assessed for *DAPK1*, *UNC5H2* and *NTN1* expression by Q-RT-PCR and DNA methylation by pyrosequencing. While *DAPK1* is not expressed in these cells, treatment with decitabine (DAC), a DNMT1 inhibitor, leads to a loss of general DNA methylation (**Figure S6 AB**) and an increased expression rate of both *DAPK1* and *NTN1* (**Figure 7A**) while the netrin-1 dependence receptors expression was not affected by DAC treatment (**Figure S7A**). Thus, chemically-induced hypomethylation directly impacts on netrin-1 and its dependence receptor pathway expression, even though we cannot exclude that the effect of DAC shown here occurs via indirect re-expression of master transcription regulators.

We thus tested whether DAC treatment, by reexpressing both *NTN1* and *DAPK1*, could resensitize H460 cells to the NET1-H-mAb treatment. While NET1-H-mAb failed to have any effect on H460 cell survival on its own, the co-treatment of the NET1-H-mAb and DAC significantly increased cell death as compared to DAC treatment alone (**Figures 7B and 7C**). Interestingly, the addition of recombinant netrin-1 led to a reversion of the cell death and apoptosis induction, in vitro (**Figures S7B-E**). Similar results were obtained using azacytidine, another DNMT1 inhibitor (**Figures S7F-H**) and with other cancer lines (not shown). To formally demonstrate that the mode of action of the combination epidrug + NET1-H-mAb occurs through *UNC5H2*-induced apoptosis, we generated by shRNAs strategy H460 cell lines stably silenced

for *DAPK1*, *UNC5H2* and *NTN1*. Efficiency of the shRNAs was analyzed upon DAC treatment (**Figure 7D**). According to the proposed mode of action, the silencing of *NTN1* was sufficient to trigger apoptosis upon DAC treatment at a same extent with or without a NET1-H-mAb, while silencing of *DAPK1* or *UNC5H2* upon DAC induced a loss of apoptotic response to the combined treatment DAC + NET1-H-mAb (**Figure 7E**).

To assay the potential effect of the DAC+ NET1-H-mAb on tumor growth, H460 cells were engrafted in nude mice. DAC treatment increased levels of expression of *DAPK1*, netrin-1 and *UNC5H2* (**Figures 8A-B**), and decreased the global DNA methylation level in xenografted tumors (**Figure S8A**). Of interest, the combination of DAC + NET1-H-mAb induced an increased level of apoptosis in the treated tumors (**Figures 8C-E**), while neither angiogenesis nor proliferation levels were significantly affected (**Figures S8B and S8E**). Finally, while either DAC or antibodies against netrin-1 failed to show any significant effect on tumor growth inhibition, the combination of both molecules led to a decreased tumor growth and tumor weight, in vivo (**Figures 8F and 8G and Figure S8E**).

Non-GMP Safety analysis of the NET1-H-mAb

As the pharmacology data support a potential therapeutic benefit for the use of the NET1-H-mAb, one key aspect before testing the antibody in human clinical trials is to evaluate the potential toxic and/or adverse events related to NET1-H-mAb administration. This is especially important when considering that netrin-1 function has never been studied in adult mammals because of the embryonic lethality of the netrin-1 mutant mice [267] and the absence of reported conditional netrin-1 mutant animals. In vivo toxicology studies have been performed in both mice and cynomolgus monkey. In mice, NET1-H-mAb was given i.p. for 7 days at up to 75mg/kg/day, followed by 7-day recovery period. In monkey, NET1-H-mAb was given i.v. (perfusion) at 100mg/kg twice a week for 14 days, followed by a 14-day recovery period. No

clinical, hematological nor biochemical sign of toxicity was noted in these studies, suggesting that NET1-H-mAb is well tolerated at high doses in both mice and monkey.

Discussion

Interestingly, in our combined structure-driven approach in conjunction with the characterization of a humanized antibody blocking the netrin-1 interaction with UNC5H2, this work has revealed the importance of the highly conserved V-2 domain and indicated key amino-acid residues involved in UNC5H binding.

Our experiments reveal that UNC5H2 and NEO1/DCC associate with netrin-1 in the nanomolar range, at two distinct, but spatially related, binding epitopes. However, the netrin-1-mediated interactions with DCC appear to be more complex than previously assumed [312, 313]. While Xu et al. proposed the implication of the domain VI of netrin-1, Finci et al. suggest a 2-stage binding modus with key roles for domains V-1/V-2, respectively. The fact that the NET1-H-mAb is not able to inhibit the interaction between netrin-1 and DCC but is able to trigger DCC-induced apoptosis in netrin-1 expressing cells (data not shown) suggests that while the netrin-1 motif of interaction of DCC and UNC5Hs are different, there is a structural and functional link between DCC and UNC5H interaction with that remains to be further explored.

We present here the description of a therapeutic drug candidate able to efficiently inhibit the interaction of with its receptors UNC5H, leading to the inhibition of tumor growth, in mouse models. Of interest, we show here that in the fraction of cancer where netrin-1 is not up-regulated, the UNC5H death effector DAPK1 is silenced by promoter methylation and that combining epidrugs reactivating both netrin-1 and DAPK1 and the presented anti-netrin-1 antibody is inducing robust tumor growth inhibiting effects. Thus, patients showing tumor DAPK1

promoter hypermethylation (and this may be a relatively feasible companion test for patient treatment) may represent an important pool of patients that could benefit from a combination epidrug + NET1-H-mAb. The first-in-class-first-in-man phase I clinical trial that is scheduled to open by end of 2015 should then provide key information on whether interfering with netrin-1/UNC5H interaction represents a valuable strategy to fight cancer.

Methods

A full description of the methods is provided in Supplementary Information.

Design of chimeric constructs, site-directed mutagenesis, recombinant expression and purification of netrin-1 and UNC5H2. Netrin-1 from *Mus musculus* lacking the C-terminal domain (NP_032770, aa: 24-457) and the extracellular domains of UNC5H2 (CAD32251, aa: 25-374), UNC5H2 IgG1-2 (CAD32251, aa: 27-247), UNC5H2 IgG1 (CAD32251, aa: 52-153), and UNC5H2 IgG2 (CAD32251, aa: 154-245) carrying a C-terminal double *Strep*-tag II were produced from HEK293 cells as described in the SI. Chimeric molecules were generated by overlap PCR using the Q5 (New England Biolabs) polymerase according the description in the SI.

Crystallization and data collection. netrin-1 crystals were grown by hanging-drop vapor diffusion at 293 K, by mixing equal volumes of protein and reservoir solution containing 0.1 M HEPES, pH 7.7, 2.7-2.8 M NaCl, 0.02-0.2 M glycine. Crystals appeared after 1 month and reached a final size of 0.1-0.5 mm after 3 months. A high-resolution native dataset (Native 1) was collected at the CMCF-BM beamline at the Canadian Light Source, Saskatoon, Canada. A three-wavelengths anomalous derivative dataset ($\lambda 1$ - $\lambda 3$) from a crystal soaked in Ta₆Br₁₂ was obtained on beamline X06SA at the Swiss Light Source, Villigen, Switzerland. Two native single

wavelength anomalous datasets (S-SAD 1 and 2) for sulphur phasing were collected on beamline X06SA and another three (S-SAD3-5) were collected at beamline 23-ID-B of the Advanced Photon Source, Argonne National Laboratory, Argonne, USA. The native and all three TABR-MAD datasets were indexed, integrated and scaled with the HKL2000 suite (Otwinowski, et al., 1997) and scalepack [321]. The five sulfur-SAD datasets were processed with iMOSFLM (Battye et al., 2011) and the CCP4 package (Collaborative Computational Project [322]). The netrin-1 crystals grew in spacegroup P₃₂21 with one molecule in the asymmetric unit. All crystals featured strong anisotropic diffraction, so we performed ellipsoidal truncation of the high resolution dataset using the program Anisotropyxfiles [323] and anisotropic scaling in Phaser [324]. Structure determination and refinement is described in detail in SI and followed protocols/models. The register of all 17 disulfide bridges, the position of the six methionine residues and the structural calcium were determined using the anomalous signal of sulphur and calcium from the 1.90745 Å long-wavelength datasets (Supp. Table 2). The best quality electron density map was generated in SHARP using the high-resolution dataset (Native 1) and all five long-wavelength datasets (S-SAD 1-5) simultaneously, employing the same phase improvement procedure as above, but using the current model to generate the solvent mask. This map was of unrivaled quality and allowed to complete the entire model. The structure was refined in REFMAC [325] and COOT. Refinement strategies included bulk solvent correction and anisotropic scaling of the data, individual coordinate refinement and TLS parameterization. Real-space refinement was performed in COOT into a maximum likelihood-weighted 2mFo-DFc map calculated in REFMAC. The final model was refined to 2.6 Å with R_{work} and R_{free} values of 24.6% and 29.4%. The quality of the structure was validated with SwissModel and PROCHECK [326, 327]. The final model comprises amino acid residues 36-456 except for residues 83-85 which are disordered. The model further contains one calcium ion, two chloride ions, one glycine and sixteen water molecules. The side chains of Asn95, Asn116 and Asn131 are glycosylated with the following partial glycan structures visible: α-D-mannose(1-3)[α-D-mannose(1-3)α-D-mannose 1-6] β-D-mannose(1-4)β-D-N-acetyl glucosamine(1-4)β-D-N-acetyl glucosamine-Asn95; β-D-N-acetyl glucosamine-Asn116; β-D-N-acetyl glucosamine(1-4)[α-L-fucose(1-6)]β-D-N-acetyl glucosamine-Asn131. The carbohydrate structures were validated using PDB-CARE [328] and CARP [329, 330]. Interface contacts were determined using FastContact and electrostatic potentials were generated using APBS [331, 332]. Buried surface area values of protein-protein interactions were calculated using the PISA webserver for a probe radius of 1.4 Å [333]. Structure figures were prepared using the program PyMOL and sequence conservation analysis was performed using MULTILAN [334] and ESCRIPT [335].

Solid Phase Binding, Surface Plasmon Resonance and Cell adhesion Assays. ELISA type assays were used and are described in SI. Assays using either a Biacore 2000 (BIAcore AB) for netrin-1/UNC5H2 or Biacore T100 (GE Healthcare) for the netrin-1 antibody are described in SI. Cell adhesion assays were performed on HEK293 cells with netrin-1 coated in 96-well plates as described in SI.

Antibody screen and humanization. HTP™ mice received 8 injections (everyday two days; first injection in presence of complete Freund adjuvant, the others with incomplete adjuvant) of 100 µg netrin-1-Fc (Adipogen). Hybridoma fusion was performed 2 weeks after the first immunization (Abpro, Lexington, MA). Hybridoma supernatants were screened for specific monoclonal anti-netrin-1 antibodies using a dual-antigen ELISA assay (netrin-1-Fc and irrelevant Fc chimeric protein). A secondary ELISA-type assay was used to select monoclonal antibodies able to block the interaction of netrin-1 with DCC or UNC5H2. A murine monoclonal antibody (NET1-M-mAb) was then selected. Humanization of the antibody was performed by fusing in frame a combinatorial library of the NET1-M-mAb antibodies to a validated collection of human frameworks (Bioatla Express Humanization™).

Epitope Mapping. Epitope mapping was performed by Pepscan (Lelystadt, The Netherlands) using an array of 590 15-amino acid linear peptides covering the whole sequence of human netrin-1 (without the signal peptide) with a peptide-peptide overlap of 14 amino-acids. Linear peptides were synthesized using standard Fmoc- chemistry and deprotected using trifluoroic acid. The 455-well credit-card format polypropylene cards containing the covalently linked peptides were incubated 30min at 25°C in PBST (PBS- 1% Tween 80) containing 5% SQ (SQ, Super-Q, 4% horse serum (v/v), 5% ovalbumin (w/v) in PBST. After washing, the peptides were incubated with the NET1-H-mAb (1 µg/mL) PBST-0.1% SQ. After washing, the peptides were incubated with a 1/1000 dilution of anti-mouse antibody peroxidase conjugate (SouthernBiotech) for one hr at 25° C. After washing, the peroxidase substrate 2,2'-azino-di-3-ethylbenzothiazoline sulfonate (ABTS) and 2 microlitres of 3 percent H₂O₂ are added. After one hr, the color developments are quantified with a charge coupled device (CCD) – camera and an image processing system.

Generation of HeLa clones expressing UNC5H2 and netrin-1, cell lines and treatments.

The generation the HeLa cells expressing rat UNC5H2 in response to doxycyclin is described in SI and is based on the Sleeping beauty vectors kindly provided by R Marschalek (Goethe-University of Frankfurt, Germany). Stable clone was further infected with either (i) Self-inactivating HIV-1-derived vector encoding netrin-1 under the control of Human Elongation Factor-1 alpha (EF-1 Alpha) promoter or (ii) corresponding mock vector. SKMEL5, A549, H358, GRANTA-519, OCYL3 or H460 cells were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA). After plating ($6 \cdot 10^4$ per well in six-well plates), cells were grown 3 days in medium containing 10 μ M decitabine (Sigma-Aldrich) or 2 μ M 5-azacytidine (Sigma-Aldrich) renewed every day, and then cultured with NET1-H-mAb antibody 10 μ g/mL and/ or recombinant FLAG-tagged netrin-1 (5 μ g/mL (Adipogen) in serum deprived condition for 48 hr.

Cell death and Soft agar assays. FACS SubG1 quantification, PI-based Incucyte imaging, caspase activity and TUNEL assays were used as described in SI. Soft agar assay were performed as previously described but adapted to 6 wells plate surface with 250000 cellules plated per well.

Inflammatory model of spontaneous colon cancer. Mice were treated with AOM (azoxymethane) +DSS (inflammatory agent dextran sodium sulfate) and treated with PBS or netrin-1 antibody intraperitoneally as described previously. Briefly, pathogene-free 8-weeks old female Wild type Balb/C mice were injected intraperitoneally with 10 mg/kg of AOM dissolved in PBS. The day after, 2.5% DSS (inflammatory agent dextran sodium sulfate) was given in the drinking water over one week, followed by 2 weeks of regular water. Mice were treated with DSS for 1 week every until the tenth week of the experiment and were injected three time per week with netrin-1 antibody or PBS. The animals were then sacrificed and the colon was removed for histological analysis.

In vivo xenograft models. Different human cell lines were s.c. implanted on the right flank of 5 weeks old female Swiss/nude mice. Tumor volumes (V) were determined by the formula $V = 0.5$ (length \times width²) with a caliper. 100 \pm 20mm³ tumors were established before randomization into groups (10 mice each). Netrin-1 antibody or an isotypic control were i.v. or i.p. injected into mice

at 10 mg/kg twice a week. Percent of Tumor Growth Inhibition (%TGI) was determined for each cell line grafted at the day indicated in the table and calculated by the formula $TGI (\%) = (1 - T/C) \times 100$ where T indicates the mean tumor volume of test group (treated with netrin-1 antibody) at day d, and C indicates the mean volume of the isotype control-treated group. For combination experiment, 10 mg/kg of NET1-mAb or PBS was i.p injected twice a week, and decitabine was s.c injected 3 times a week for 3 weeks (dosing: 0.4 mg/kg; vehicle: PBS). The treatments efficiency on cell death induction, DNA methylation, and protein expression, was assessed in tumors extracted from mice treated for only one week after reaching 100 mm³. In a second protocol, mice were included in the study at day 8 for similar treatments. At day 27, mice were sacrificed, and tumors were extracted for weight measurement.

Immunohistochemistry analysis of xenografted cell lines and Quantification.

Immunohistochemistry staining was performed on an automated immunostainer (Ventana Discovery XT, Roche, Meylan, France) using DABmap Kit according to the manufacturer's instructions. Tissue samples were fixed in 10% buffered formalin and embedded in paraffin. After antigen unmasking (citrate buffer pH 7.3, 98 °C for 35 min), immunostainings were performed with a rat anti-mouse netrin-1 (R&D), a rabbit polyclonal anti-DAPK1 (Acris) or an anti UNC5H2 (Sigma) antibodies, using the Novolink kit (Leica) for revelation. Apoptotic cells staining were performed using a rabbit cleaved caspase-3 specific antibody (Cell Signaling) and the *In Situ* Cell Death Detection kit POD (Roche). Angiogenesis was measured using a rabbit polyclonal CD31 (Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1) antibody (ANASPEC), and cell proliferation rate was determined using a mouse monoclonal Mib1 clone specific antibody (DAKO). Image analysis was performed using a light microscope (Eclipse E400, Nikon France, Champigny, France) equipped with a tri-CDD video camera (Sony, Japan). Quantitative values were determined by morphometric analysis (Histolab, Microvision Instruments, Evry, France) of at least 40 fields per staining at X200 magnification for the tumor sections.

RNA Isolation and quantitative PCR (Q-RT-PCR). RNA extraction and quantitative RT-PCR (Q-RT-PCR) were performed as described in SI using primer sequences for target genes shown in Table S4. Gene expression profiles of human samples and cell lines were validated using 3 housekeeping genes: *PBGD*, *GAPDH* and *MBD2*.

DNA extraction, Bisulfite treatment of genomic DNA, Amplification of bisulfite converted DNA and pyrosequencing. Biopsies samples and xenografted cell lines were cryogrounded in liquid nitrogen and DNA was extracted and purified using the Nucleospin tissue DNA extraction kit (Macherey Nagel) according to the manufacturer's protocol. DNA from cell lines was directly extracted using the standard protocol. Bisulfite treatment and pyrosequencing is described in detail in SI.

Non-GMP safety study. The safety study was performed by Covance SA. In mice, NET1-H-mAb was given i.p. for 7 days at 75mg/kg/day, followed by 7-day recovery period. In monkey, NET1-H-mAb was given i.v. (perfusion) at 100 mg/kg twice a week for 14 days, followed by a 14-day recovery period. Clinical observations were then performed that included: body weight, food consumption, overall health and behaviour (obvious sign of pain or illness, bruising, thinning fur, skin lesions, swollen urogenitals...), evaluation of injection site for irritation or necrosis (erythema, oedema, induration, haematoma). Clinical pathology was also assessed and included: hematology (white and red blood cell count), serum chemistry (key enzymes and metabolites), urinalysis (pH, proteins, glucose...), NET1-M-mAb and anti-NET1-H-mAb (ADA) dosage. Gross observations and organ collection after necropsy were also performed.

Acknowledgements

We thank C. Schulze-Briese (SLS, Switzerland), P. Grochulski (CLS, Canada) and M. Bekker (APS, USA) for assistance in data collection; S. Oezcelik and A. Paradisi for technical support and S. McKenna and S. Oezbek for critical reading and discussions. J.S is funded in part by the Multiple Sclerosis Society of Canada and by the Canadian Institute of Health Research (RPA-109759) and M.K. by the Deutsche Forschungsgemeinschaft SFB 829 grant A2 and by the Köln Fortune Programm of the Medical Faculty. This work was also supported by Netris Pharma and institutional grants from CNRS (PM), University of Lyon (PM), Centre Léon Bérard (PM) and from the Ligue Contre le Cancer (PM), INCA (PM), ANR (PM), ERC (PM), EU-FP7 HERMIONE-2MAN (PM) and Fondation Bettencourt (PM). K.P. is supported by the Cecile Vogt Fellowship and T.R.P. was supported as a CIHR Postdoctoral Fellow. J. S. is a Canada Research Chair in Structural Biology.

Author contribution

M.G, M.M., J.G.D., D.G., A.Bo., R.A, Y.D., A.Be, S.D., R.R., T.R.P., R.D., P.M., M.K. and J.S. designed the research. M.G., M.M., D.N., J.G.D., D.G., A.Bo., D.N., R.R., T.R.P., G.O., N.O., K.M., F.S., K.P. and J.S. carried out the research. M.G., M.M., R.R., T.R.P., K.P., M.K., R.D., and J.S. analyzed the data. M.M., R.D., R.R., P.M., M.K. and J.S. wrote the paper with input from the other authors.

Author information

The atomic coordinates for netrin-1 have been deposited in the Protein Data Bank database under accession number 4OVE.

References

- Collaborative Computational Project, (1994). The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* *50*, 760-763.
- Baker, N. A., Sept, D., Joseph, S., Holst, M. J., and McCammon, J. A. (2001). Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *98*, 10037-10041.
- Bongo, J. B., and Peng, D. Q. (2014). The neuroimmune guidance cue netrin-1: a new therapeutic target in cardiovascular disease. *Journal of cardiology* *63*, 95-98.
- Brasch, J., Harrison, O. J., Ahlsen, G., Liu, Q., and Shapiro, L. (2011). Crystal structure of the ligand binding domain of netrin G2. *J Mol Biol* *414*, 723-734.
- Camacho, C. J., and Zhang, C. (2005). FastContact: rapid estimate of contact and binding free energies. *Bioinformatics* *21*, 2534-2536.
- Cirulli, V., and Yebra, M. (2007). Netrins: beyond the brain. *Nat Rev Mol Cell Biol* *8*, 296-306.
- Corpet, F. (1988). Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res* *16*, 10881-10890.
- Delloye-Bourgeois, C., Brambilla, E., Coissieux, M. M., Guenebeaud, C., Pedeux, R., Firlej, V., Cabon, F., Brambilla, C., Mehlen, P., and Bernet, A. (2009a). Interference with netrin-1 and tumor cell death in non-small cell lung cancer. *Journal of the National Cancer Institute* *101*, 237-247.
- Delloye-Bourgeois, C., Fitamant, J., Paradisi, A., Cappellen, D., Douc-Rasy, S., Raquin, M. A., Stupack, D., Nakagawara, A., Rousseau, R., Combaret, V., *et al.* (2009b). Netrin-1 acts as a survival factor for aggressive neuroblastoma. *The Journal of experimental medicine* *206*, 833-847.
- Evans, P. (2006). Scaling and assessment of data quality. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* *62*, 72-82.
- Finci, L. I., Kruger, N., Sun, X., Zhang, J., Chegkazi, M., Wu, Y., Schenk, G., Mertens, H. D., Svergun, D. I., Zhang, Y., *et al.* (2014). The crystal structure of netrin-1 in complex with DCC reveals the bifunctionality of netrin-1 as a guidance cue. *Neuron* *83*, 839-849.
- Fitamant, J., Guenebeaud, C., Coissieux, M. M., Guix, C., Treilleux, I., Scoazec, J. Y., Bachelot, T., Bernet, A., and Mehlen, P. (2008). Netrin-1 expression confers a selective advantage for tumor cell survival in metastatic breast cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *105*, 4850-4855.
- Forcet, C., Stein, E., Pays, L., Corset, V., Llambi, F., Tessier-Lavigne, M., and Mehlen, P. (2002). Netrin-1-mediated axon outgrowth requires deleted in colorectal cancer-dependent MAPK activation. *Nature* *417*, 443-447.

Gasteiger, E., Gattiker, A., Hoogland, C., Ivanyi, I., Appel, R. D., and Bairoch, A. (2003). ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res* 31, 3784-3788.

Geisbrecht, B. V., Dowd, K. A., Barfield, R. W., Longo, P. A., and Leahy, D. J. (2003). Netrin binds discrete subdomains of DCC and UNC5 and mediates interactions between DCC and heparin. *J Biol Chem* 278, 32561-32568.

Goldschneider, D., and Mehlen, P. (2010). Dependence receptors: a new paradigm in cell signaling and cancer therapy. *Oncogene* 29, 1865-1882.

Gouet, P., Courcelle, E., Stuart, D. I., and Metz, F. (1999). ESPript: analysis of multiple sequence alignments in PostScript. *Bioinformatics* 15, 305-308.

Guenebeaud, C., Goldschneider, D., Castets, M., Guix, C., Chazot, G., Delloye-Bourgeois, C., Eisenberg-Lerner, A., Shohat, G., Zhang, M., Laudet, V., *et al.* (2010). The dependence receptor UNC5H2/B triggers apoptosis via PP2A-mediated dephosphorylation of DAP kinase. *Molecular cell* 40, 863-876.

Hussain, S. A., Carafoli, F., and Hohenester, E. (2011

). Determinants of laminin polymerization revealed by the structure of the alpha5 chain amino-terminal region. *EMBO Rep* 12, 276-282.

Koch, M., Murrell, J. R., Hunter, D. D., Olson, P. F., Jin, W., Keene, D. R., Brunken, W. J., and Burgeson, R. E. (2000). A novel member of the netrin family, beta-netrin, shares homology with the beta chain of laminin: identification, expression, and functional characterization. *J Cell Biol* 151, 221-234.

Krissinel, E., and Henrick, K. (2007). Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. *J Mol Biol* 372, 774-797.

Laskowsky, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S. & Thornton, J. M. (1993). PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J Appl Cryst* 26, 283-291.

Leonardo, E. D., Hinck, L., Masu, M., Keino-Masu, K., Ackerman, S. L., and Tessier-Lavigne, M. (1997). Vertebrate homologues of *C. elegans* UNC-5 are candidate netrin receptors. *Nature* 386, 833-838.

Lim, Y. S., and Wadsworth, W. G. (2002). Identification of domains of netrin UNC-6 that mediate attractive and repulsive guidance and responses from cells and growth cones. *J Neurosci* 22, 7080-7087.

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

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

Lutke, T., Bohne-Lang, A., Loss, A., Goetz, T., Frank, M., and von der Lieth, C. W. (2006). GLYCOSCIENCES.de: an Internet portal to support glycomics and glycobiology research. *Glycobiology* 16, 71R-81R.

Lutteke, T., Frank, M., and von der Lieth, C. W. (2005). Carbohydrate Structure Suite (CSS): analysis of carbohydrate 3D structures derived from the PDB. *Nucleic Acids Res* *33*, D242-246.

Lutteke, T., and von der Lieth, C. W. (2004). pdb-care (PDB carbohydrate residue check): a program to support annotation of complex carbohydrate structures in PDB files. *BMC Bioinformatics* *5*, 69.

McCoy, A. J., Grosse-Kunstleve, R. W., Adams, P. D., Winn, M. D., Storoni, L. C., and Read, R. J. (2007). Phaser crystallographic software. *J Appl Crystallogr* *40*, 658-674.

Mehlen, P., Delloye-Bourgeois, C., and Chedotal, A. (2011). Novel roles for Slits and netrins: axon guidance cues as anticancer targets? *Nature reviews Cancer* *11*, 188-197.

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

Ming, G., Song, H., Berninger, B., Inagaki, N., Tessier-Lavigne, M., and Poo, M. (1999). Phospholipase C-gamma and phosphoinositide 3-kinase mediate cytoplasmic signaling in nerve growth cone guidance. *Neuron* *23*, 139-148.

Murshudov, G. N., Skubak, P., Lebedev, A. A., Pannu, N. S., Steiner, R. A., Nicholls, R. A., Winn, M. D., Long, F., and Vagin, A. A. (2011). REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* *67*, 355-367.

Paradisi, A., Creveaux, M., Gibert, B., Devailly, G., Redoulez, E., Neves, D., Cleyssac, E., Treilleux, I., Klein, C., Niederfellner, G., *et al.* (2013). Combining chemotherapeutic agents and netrin-1 interference potentiates cancer cell death. *EMBO molecular medicine* *5*, 1821-1834.

Ramkhelawon, B., Hennessy, E. J., Menager, M., Ray, T. D., Sheedy, F. J., Hutchison, S., Wanschel, A., Oldebeken, S., Geoffrion, M., Spiro, W., *et al.* (2014). Netrin-1 promotes adipose tissue macrophage retention and insulin resistance in obesity. *Nature medicine* *20*, 377-384.

Raval, A., Tanner, S. M., Byrd, J. C., Angerman, E. B., Perko, J. D., Chen, S. S., Hackanson, B., Grever, M. R., Lucas, D. M., Matkovic, J. J., *et al.* (2007). Downregulation of death-associated protein kinase 1 (DAPK1) in chronic lymphocytic leukemia. *Cell* *129*, 879-890.

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

Serafini, T., Kennedy, T. E., Galko, M. J., Mirzayan, C., Jessell, T. M., and Tessier-Lavigne, M. (1994). The netrins define a family of axon outgrowth-promoting proteins homologous to *C. elegans* UNC-6. *Cell* *78*, 409-424.

Stetefeld, J., Mayer, U., Timpl, R., and Huber, R. (1996). Crystal structure of three consecutive laminin-type epidermal growth factor-like (LE) modules of laminin gamma1 chain harboring the nidogen binding site. *J Mol Biol* 257, 644-657.

Strong, M., Sawaya, M. R., Wang, S., Phillips, M., Cascio, D., and Eisenberg, D. (2006). Toward the structural genomics of complexes: crystal structure of a PE/PPE protein complex from *Mycobacterium tuberculosis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 8060-8065.

van Gils, J. M., Derby, M. C., Fernandes, L. R., Ramkhelawon, B., Ray, T. D., Rayner, K. J., Parathath, S., Distel, E., Feig, J. L., Alvarez-Leite, J. I., *et al.* (2012). The neuroimmune guidance cue netrin-1 promotes atherosclerosis by inhibiting the emigration of macrophages from plaques. *Nature immunology* 13, 136-143.

Wang, H., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., and Tessier-Lavigne, M. (1999). Netrin-3, a mouse homolog of human NTN2L, is highly expressed in sensory ganglia and shows differential binding to netrin receptors. *J Neurosci* 19, 4938-4947.

Winberg, M. L., Mitchell, K. J., and Goodman, C. S. (1998). Genetic analysis of the mechanisms controlling target selection: complementary and combinatorial functions of netrins, semaphorins, and IgCAMs. *Cell* 93, 581-591.

Xu, K., Wu, Z., Renier, N., Antipenko, A., Tzvetkova-Robev, D., Xu, Y., Minchenko, M., Nardi-Dei, V., Rajashankar, K. R., Himanen, J., *et al.* (2014). Neural migration. Structures of netrin-1 bound to two receptors provide insight into its axon guidance mechanism. *Science* 344, 1275-1279.

Yurchenco, P. D., and Wadsworth, W. G. (2004). Assembly and tissue functions of early embryonic laminins and netrins. *Curr Opin Cell Biol* 16, 572-579.

Figures and legends

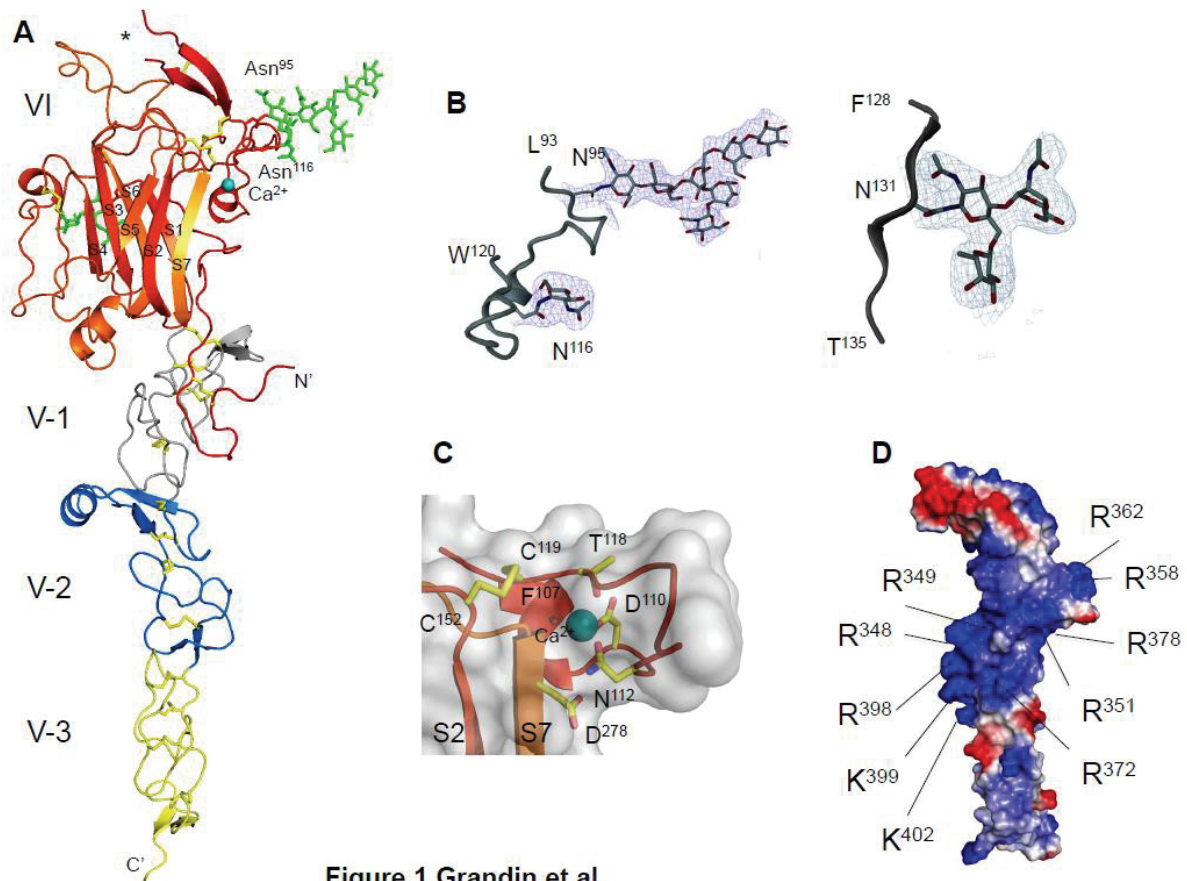


Figure 1. Overall structure of netrin-1. (A) Ribbon model of netrin-1 viewed in the “open face” orientation. The domains VI (orange-red), V-1 (silver) V-2 (blue) and V-3 (gold) are colored accordingly. N-linked glycans are drawn as green sticks, disulfide bridges are drawn as yellow sticks, and the calcium ion as blue sphere. The asterisk (*) marks amino acid residues 83-85. (B) Representative electron density map in the refined structure. Regions of all three N-linked glycan moieties are shown. Both panels show Sigma-A weighted 2Fo-Fc maps at 2.6 Å resolution (1.5 Sigma contour level). (C) Picture of the amino acid interactions mediating the calcium binding. The disulfide bridge between cysteine 119 and 152 is drawn as yellow stick and the calcium ion is drawn as blue sphere. (D) Electrostatic potential calculations of the V-domains revealed that V-2 is highly positively charged (IEP: 9.64), a feature only shared with the V-2 subdomain of NET3 (IEP: 9.76). Electrostatic potential is displayed as a color gradient from red ($-8 k_bT/e_c$) to blue ($+8 k_bT/e_c$). See also Figure S1 and Table S1, S2.

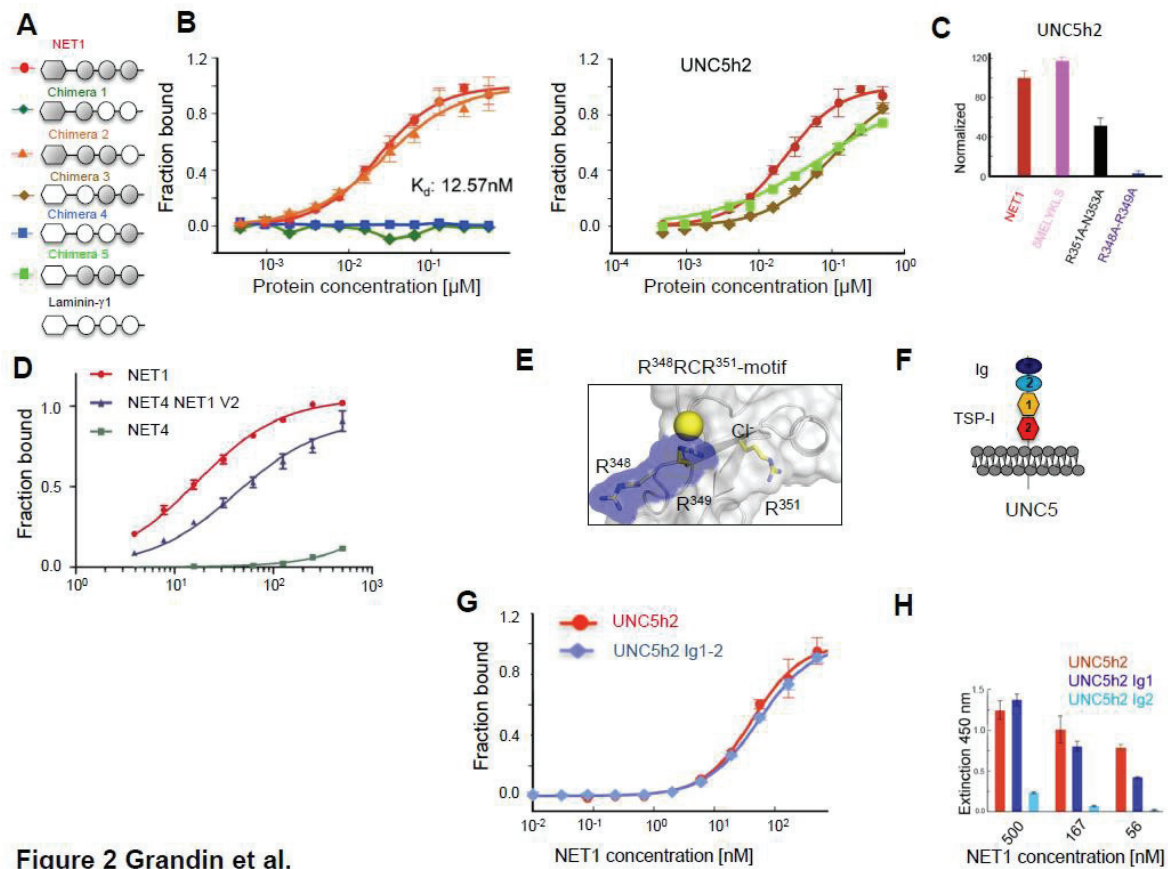


Figure 2 Grandin et al.

Figure 2. Decoding of the netrin-1-UNC5H2 interaction. (A) The cartoon represents different netrin-1 chimeras. (B) Solid-phase binding assays with netrin-1 and different chimeras demonstrate the binding activities to immobilized UNC5H2 (Left). In solid binding assays, the ectodomains of UNC5H2 were coated and incubated with serial diluted ligands netrin-1 (red) and the different chimeras. All experiments were performed three times in triplicate. (C) The curves of (B) are plotted according the fraction bound; the graph shows the binding behavior of different mutations normalized to wild type netrin-1. (D) Solid-phase binding assay of UNC5H2 to immobilized netrin-1, netrin-4, and the netrin-4 chimera containing the V-2 subdomain of netrin-1. (E) X-ray structure of the UNC5H2-binding motif (blue) at R348-R349. (F) Cartoon of UNC5H2 and (G) Solid-phase binding assay with netrin-1 to C-terminal TSP tandem. (H) The histograms show Ig1 and Ig2 binding to netrin-1. See also Figures S2 and S3.

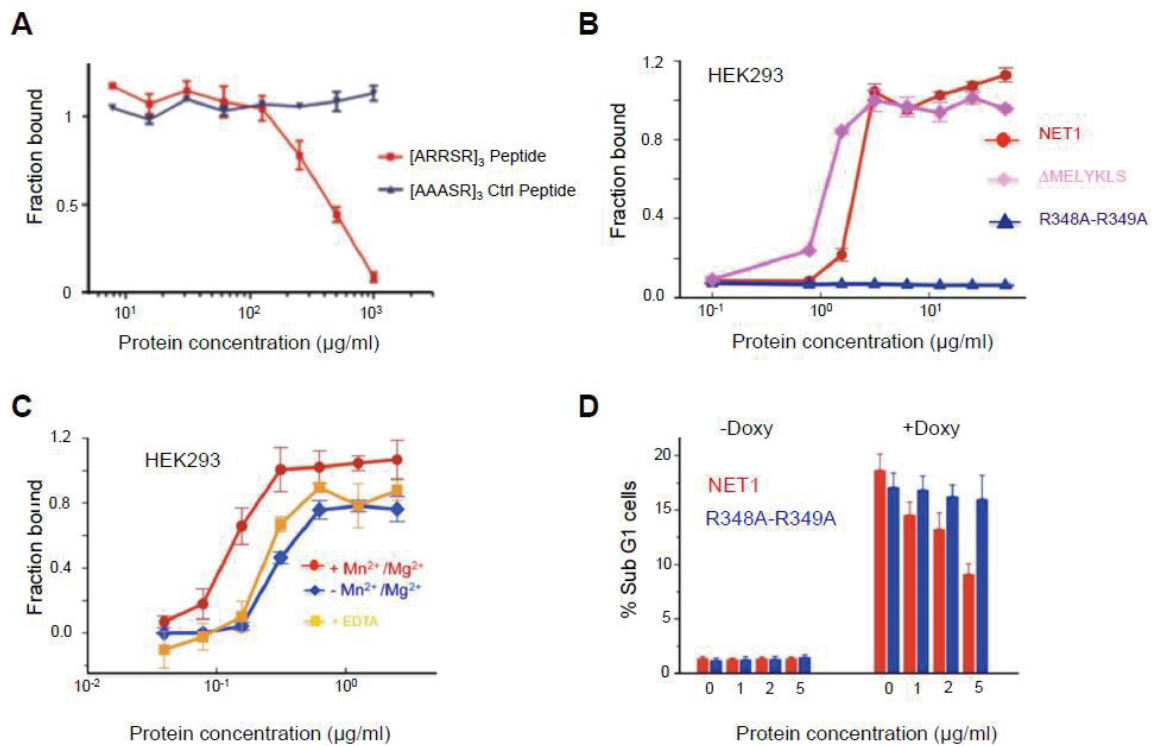


Figure 3 Grandin et al.

Figure 3. The V-2 domain of netrin-1 is required for netrin-1 mediated inhibition of UNC5H2-induced apoptosis. (A) Competition assay: netrin-1 binding to UNC5H2 in presence or not of a (ARRSR)₃ peptide containing the interaction motif, and compared to control. (B) HEK293 cell binding studies to different coated substrates. Netrin-1 is colored in red, netrin-1 R348A-R349A double mutant is in blue, and the Δ³⁵⁴MELYKLS³⁶⁰ version is drawn in magenta. (C) To detect transcription and protein levels of netrin-1 receptors in HEK293 cells RT-PCR and Western blot analysis were performed. (D). Quantification of apoptotic subG1 Mock cells induced by doxycyclin for UNC5H2 expression and treated by increasing amount of recombinant and R348A-R349A. See also Figure S4.

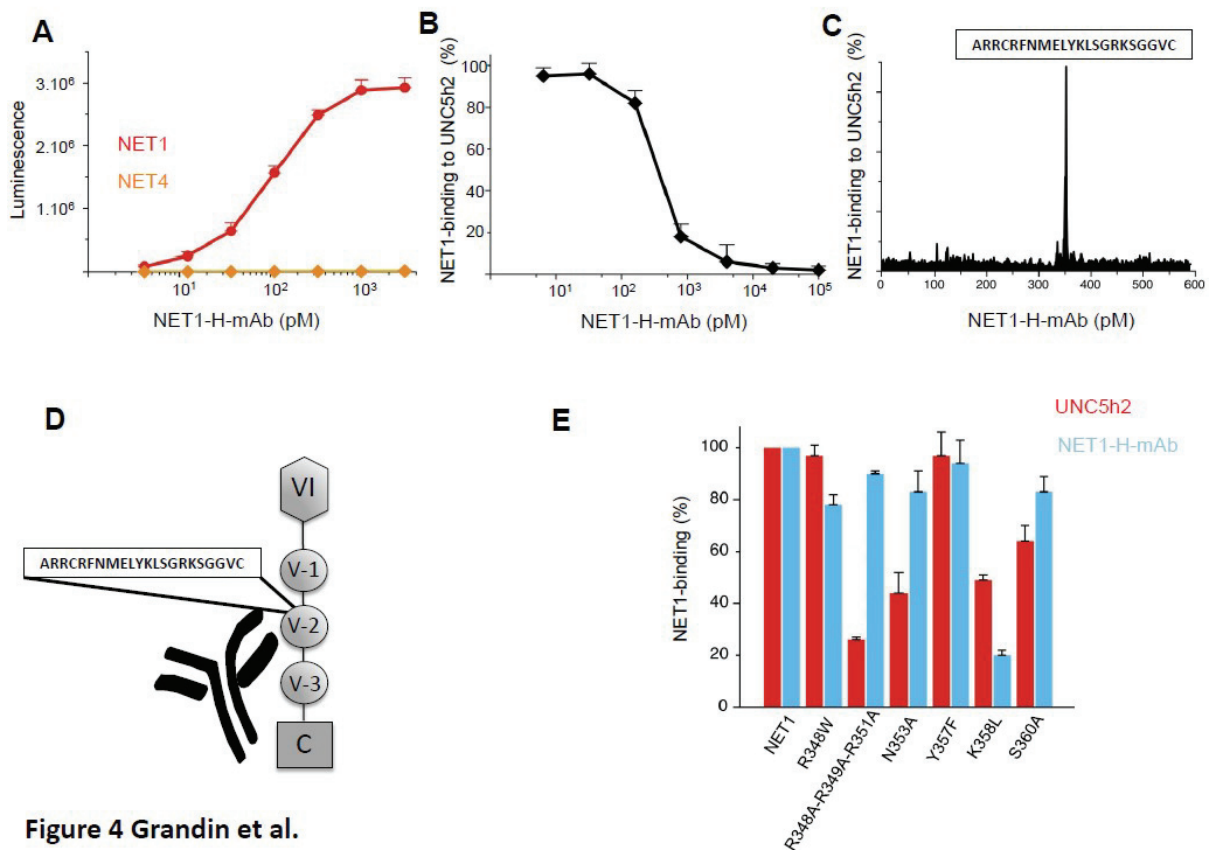


Figure 4. Humanized blocking antibody binds the V-2 domain. (A). The interaction of the NET1-H-mAb with netrin-1 was determined in a direct ELISA assay. White polystyrene coated microtiter plates were coated with netrin-1 or netrin-4 (used as a specificity control), incubated with various concentrations of the NET1-H-mAb, followed by the incubation with an HRP conjugated anti-human IgG and revealed with a chemoluminescent HRP substrate. **(B)** Plates were coated with UNC5H2, incubated with FLAG-tagged netrin-1 in presence of various concentrations of the NET1-H-mAb, followed by the incubation with an HRP conjugated anti-FLAG antibody and revealed with a chemoluminescent HRP substrate. **(C)** Raw data obtained by screening NP-137 against the over-lapping peptide library of 590 linear peptides (x-axis). The signal strength of the interaction is visualized on the y-axis. The peak corresponds to the following amino-acid sequence: ARRCRFNMELYKLSGRKSGGVC. **(D)** Scheme highlighting the epitope of netrin-1 recognized by the NET1-H-mAb. **(E)** Interaction of AP-conjugated wild-type or mutant AP-conjugated netrin-1 with the NET1-H-mAb or UNC5H2. The ability of the various AP-netrin-1 mutants (see details in **Table S3**) to interact with the NET1-H-mAb or with UNC5H2 was determined in an ELISA-type assay. Plates coated either with UNC5H2 or the NET1-H-mAb were incubated with the various mutants and the bound alkaline phosphatase conjugated netrin-1 was detected using a chemoluminescent substrate of AP.

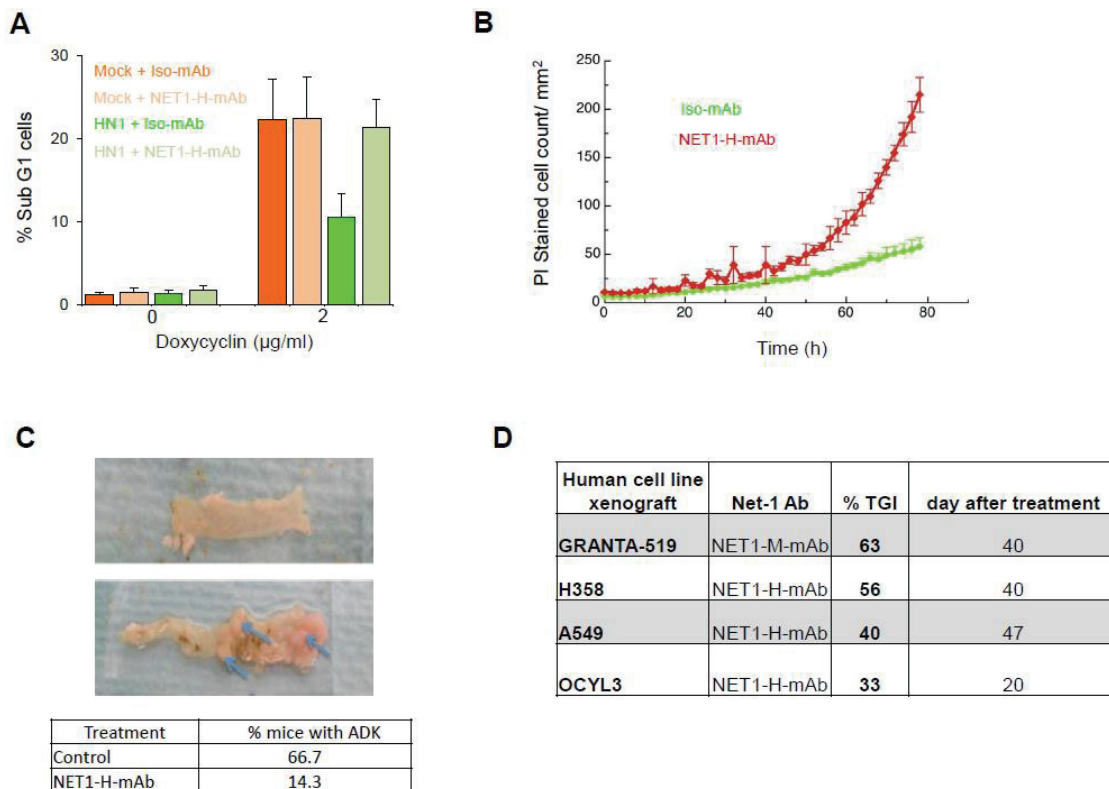


Figure 5 Grandin et al.

Figure 5. In vitro and in vivo activity of the NET1-H-mAb. (A) Flow cytometric quantification of apoptotic subG1 Mock or netrin-1 (HN1) expressing cells forced to express UNC5H2 induced by doxycycline (2 µg/ml) and treated with 10 µg/ml of either the isotypic mAb or the NET1-H-mAb. (B) SKMEL5 cells were plated in presence of 20 µg/mL of either the isotypic mAb or the NET1-H-mAb. Cell death was assayed using propidium iodide uptake over time in the IncuCyte imager. (C) Representative images of open sections of colon removed from mice treated with AOM and DSS in presence (2 mg/kg twice a week, n=7) (top) or absence of netrin-1-antibody (bottom). Macroscopic tumors are indicated with arrows. The NET1-H-mAb prevents formation of adenocarcinoma (Adk) lesions. E, Different human cell lines, (lung adenocarcinoma epithelial cell lines H358, A549, and lymphoma cell lines GRANTA-519, oci-ly3) were grafted in nude mice (n = 10) and i.v. (H358, A549, oci-ly3) or i.p. (GRANTA-519) treated twice a week either with NET1-H-mAb, NET1-M-mAb or a corresponding isotypic control (10 mg/kg). Percent of Tumor Growth Inhibition (%TGI) was determined for each cell line, at the day after treatment indicated in the table. See also Figure S5.

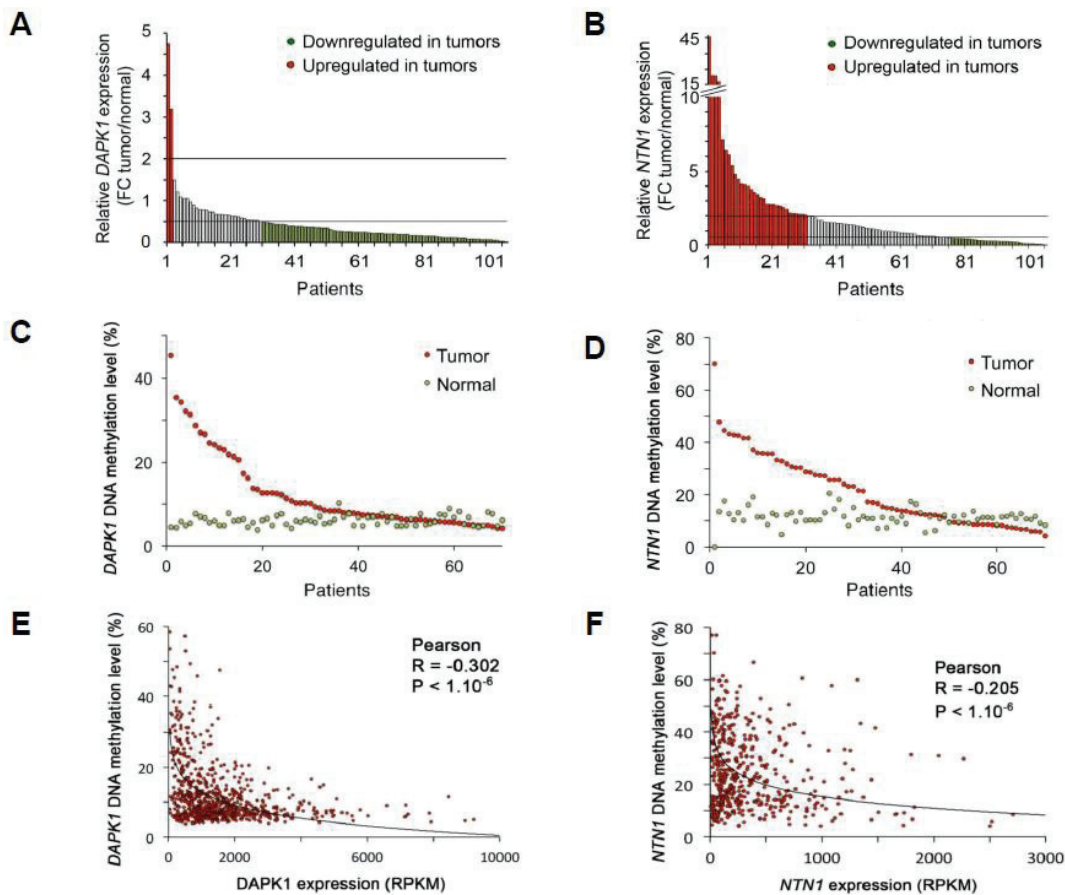


Figure 6 Grandin et al.

Figure 6. *DAPK1* and *NTN1* are altered by DNA hypermethylation in non-small cell lung cancers. (A and B) *DAPK1* and *NTN1* are downregulated (green bars) or upregulated (red bars) when compared to the paired normal tissues (Fold Change (FC), RNA seq data from TCGA lung cohorts, n = 106 pairs). (C and D) *DAPK1* and *NTN1* are hypermethylated in approximately 33% and 41% of lung tumor tissues, respectively, when compared to the paired normal tissues (Fold Change >2, 450K Illumina data from TCGA lung cohorts, n = 70 pairs). (E and F) Correlation between *DAPK1* and *NTN1* gene expression and mean DNA methylation level at 5'UTR CpG for *DAPK1* and at N-Shore CpG for *NTN1* in lung tumor cohorts (TCGA, n = 798). Pearson correlation, $p < 10^{-6}$, $r = -0.302$ for *DAPK1* and $p = 1.10^{-6}$ $r = -0.205$ for *NTN1*, respectively when p value threshold = 0.01. See also Figure S6

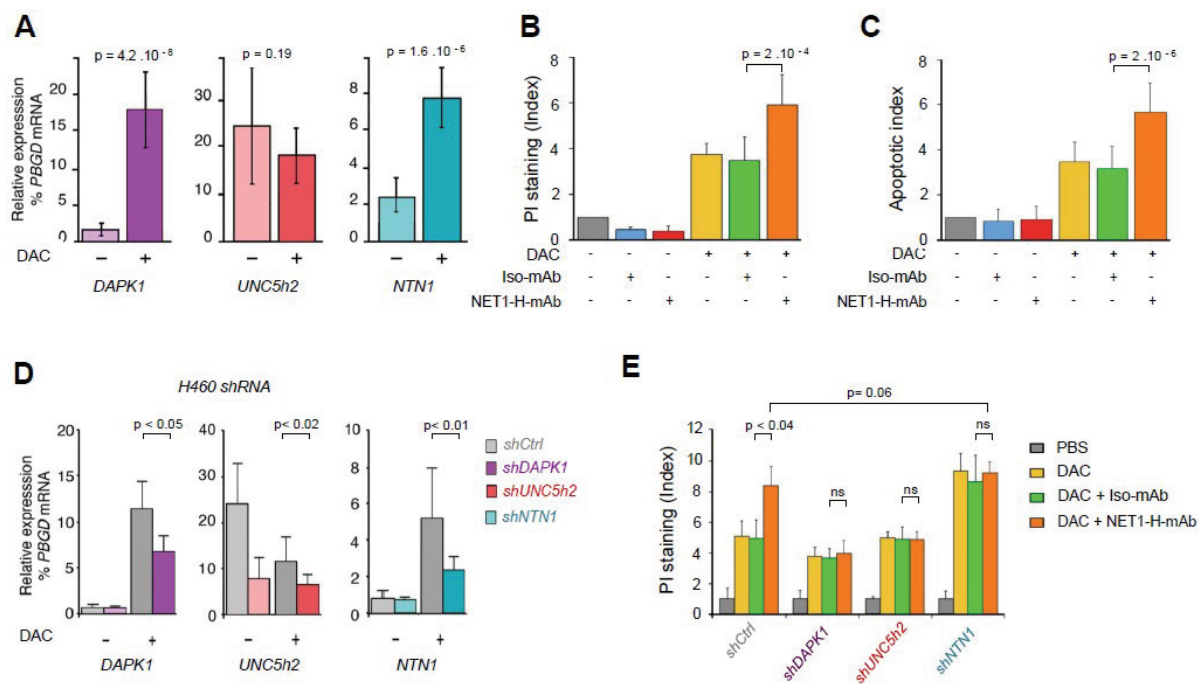


Figure 7. Decitabine treatment is sufficient to resensitize tumor cell to netrin-1 interference in vitro. (A) Gene expression was measured by Q-RT-PCR after 72 hr from H460 cells treated daily with 10 μ M decitabine (DAC). *PBGD* expression level was used as internal control. (B and C) Cells were treated with decitabine (DAC, 10 μ M, 72hr), and/or NET1-H-mAb (10 μ g/mL, 48 hr) and/or Iso-mAb (10 μ g/mL, 48 hr). (B) PI staining. (C) apoptotic indexes. (D) Gene expression was measured by Q-RT-PCR after 72 hr from stable cell lines H460-shControl, H460-sh*DAPK1*, H460-sh*UNC5H2* and H460-sh*NTN1* treated daily with 10 μ M decitabine (DAC). *PBGD* expression level was used as internal control. (E) Apoptotic index of H460-shControl, H460-sh*DAPK1*, H460-sh*UNC5H2* and H460-sh*NTN1*. Cells were treated with decitabine (DAC, 10 μ M, 72 hr), and/or Iso-mAb (10 μ g/mL, 48 hr) and/or NET1-H-mAb (10 μ g/mL, 48 hr). Error bars, SEM; p values, two-tailed unpaired Student's t test from at least 3 independent experiments. See also Figures S6 and S7.

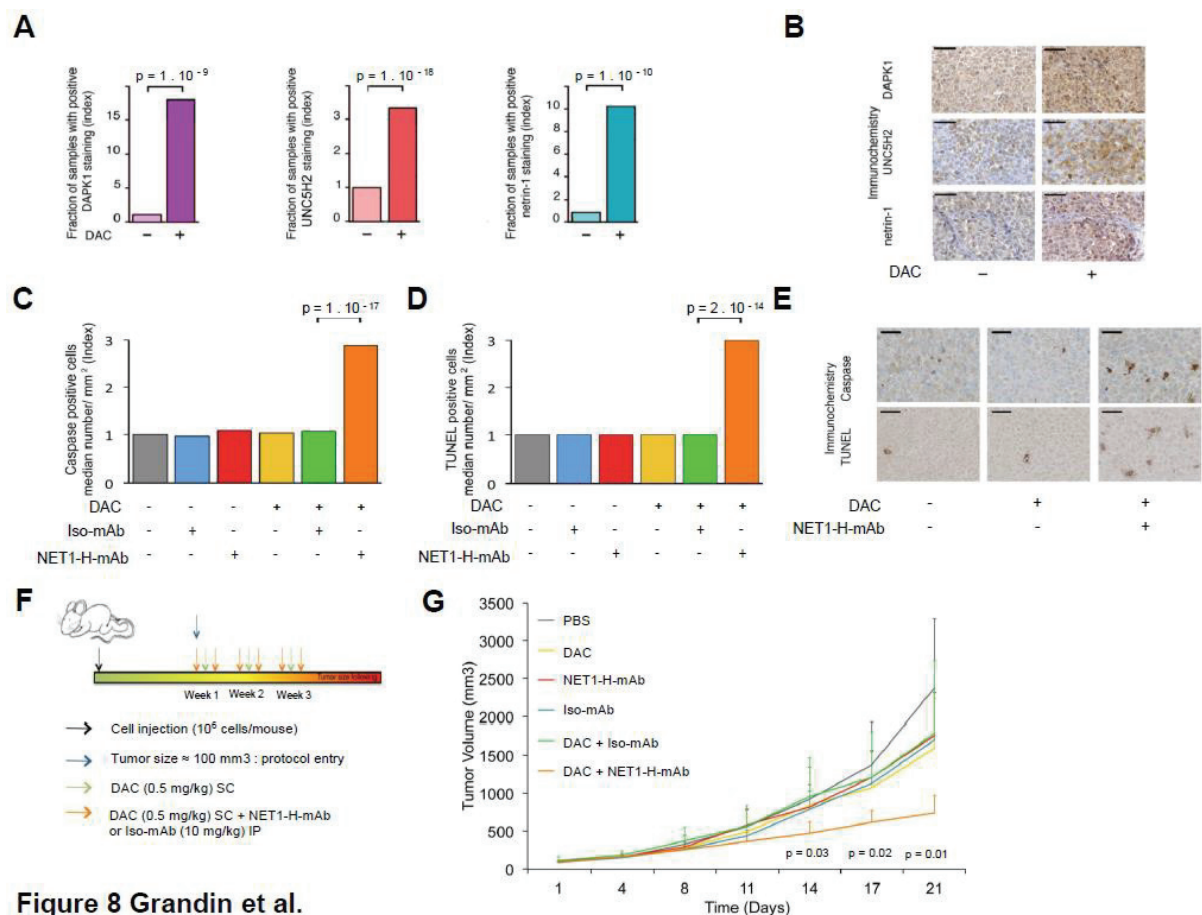


Figure 8 Grandin et al.

Figure 8. Decitabine treatment is sufficient to resensitize tumor cell to netrin-1 interference in vivo. (A-E) Tumor xenografts were fixed in formalin, paraffin embedded, sliced into 4 μm sections. (A) Levels of DAPK1, UNC5H2, and netrin-1 were expressed as percentage of total tumor surface. (B). Representative sections corresponding to (A), bars represent 50 μm . (C) Activated caspase-3, median number of cells per mm^2 were measured using antibody against cleaved caspase-3 and the (D) DNA fragmentation median number of cells per mm^2 were determined by TUNEL assay; mean values from 4 independent tumors par treated groups; p values, Mann-Whitney test. (E) Representative tumor sections corresponding to the histograms on the right, bars represent 50 μm . (F) Schematic representation of treatment schedules of mice with pre-established H460 subcutaneous tumors. When tumors reached 100 mm^3 , mice were injected subcutaneously with decitabine (0.5 mg/kg) or PBS and/or intraperitoneally with NET1-H-mAb (10 mg/kg) or Iso-mAb (10 mg/kg). (G) Tumor volumes were measured twice a week. Statistical significance of differences between DAC + Iso-mAb -groups and DAC + NET1-H-mAb -groups was determined by two-tailed unpaired Student's t test. See also Figure S8.

Supplemental information

Structural decoding of the Netrin-1-UNC5 interaction and its therapeutical implications in cancers

Melodie Grandin, Markus Meier, Jean Guy Delcros, Denise Nikodemus, Raphael Reuten, Trushar R. Patel, David Goldschneider, George Orriss, Natalie Okun, Amina Boussouar, Riad Abes, Yann Dean, David Neves, Agnes Bernet, Stephane Depil, Fiona Schneiders, Kate Poole, Robert Dante, Patrick Mehlen, Manuel Koch and Jörg Stetefeld

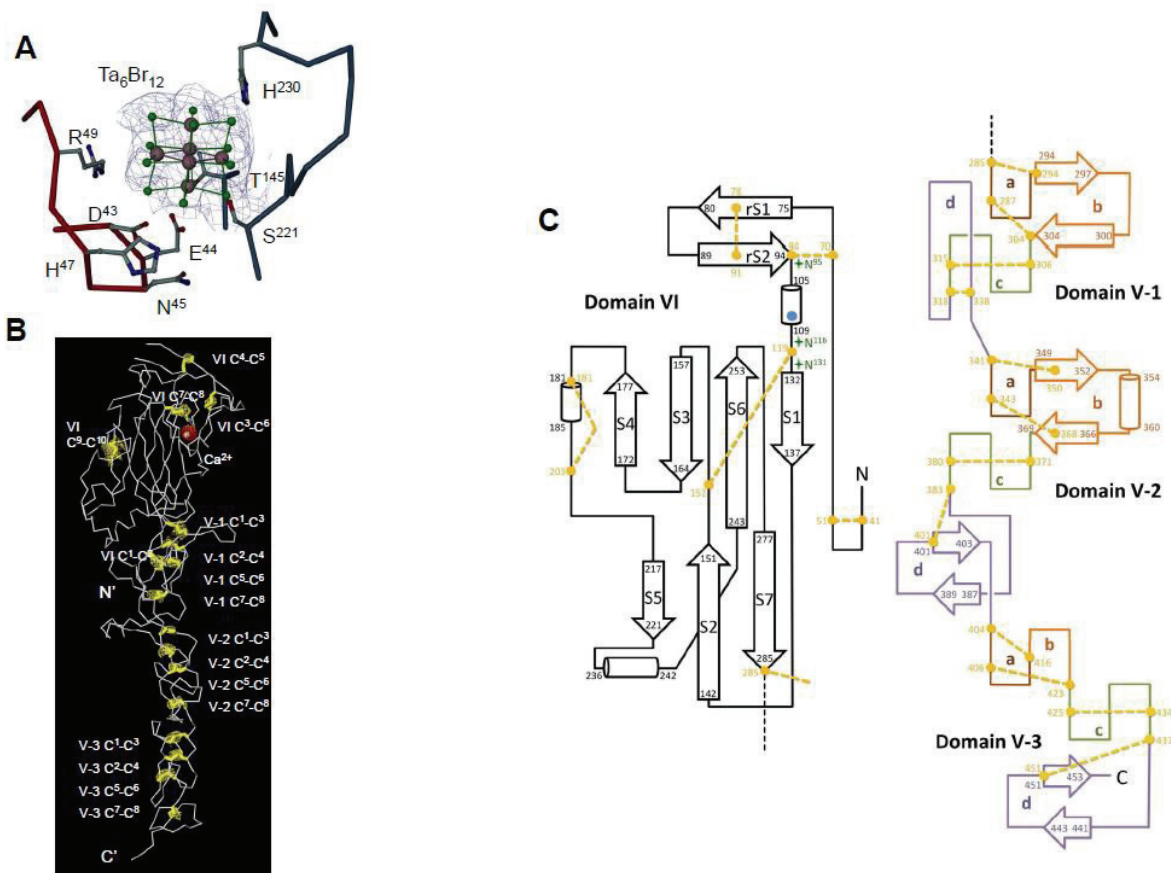


Figure S1 Grandin et al.

Figure S1. Related to Figure 1. Structure determination and Secondary Structure diagram of NET1. (A) Insight the Ta_6Br_{12} binding site between the N-terminal section of NET1 in the asymmetric unit (red) and a crystal symmetry mate (blue). The Difference Fourier map is displayed at 4 Sigma contour level. In the refined cluster Ta is illustrated as pink sphere and Br is depicted as green spheres. Both binding partners form a hook-like arrangement to fix the cluster in a tight pocket. (B) Difference Fourier map using the S-SAD anomalous signal measured at 1.9 Å wavelength. Individual Fourier peaks (4.0 Sigma contour level) for all 17 disulfide bridges are drawn in yellow with the refined cysteine positions shown as sticks. The anomalous signal allowed for the interpretation of the calcium signal (red Fourier peak). (C) Disulfide connectivity in domains VI and V are indicated by orange dotted lines, visible N-linked glycans by green cartoons with the Asn residues N^{95} , N^{116} and N^{131} highlighted. The structural calcium at the C-terminal end β -strands are depicted as arrows and the α -helices as cylinders, each labeled with the first and last residue. The cysteine residues 1-3, 2-4, 5-6, and 7-8 in subdomains V-1 to V-3 are bridged together forming the loop segments a-d accordingly. The individual loop segments are shown in different color codes.

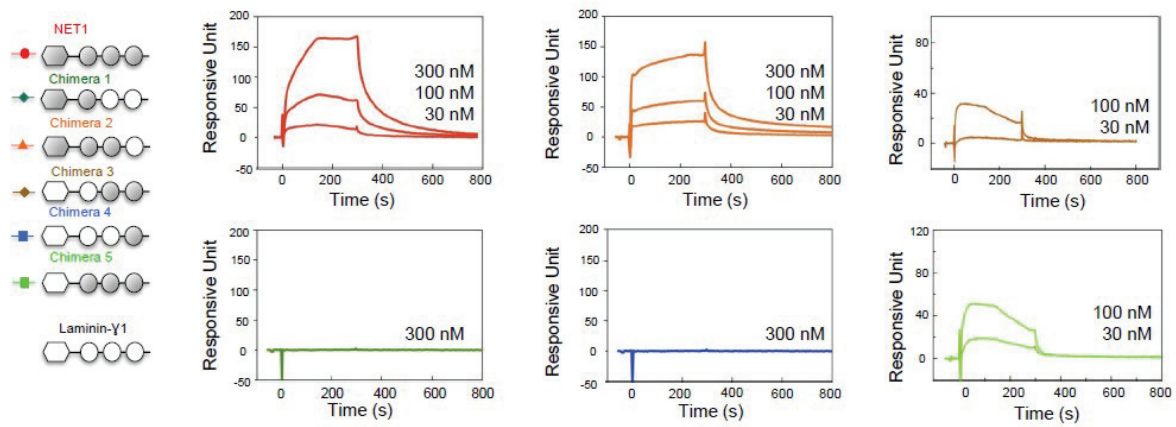


Figure S2 Grandin et al.

Figure S2. Related to Figure 2. Binding studies of NET1 and different chimeras to decipher binding epitopes for UNC5h2. **(A)** The cartoon represents different NET1 chimeras color code (Right). Surface Plasmon Resonance analysis was performed as an independent second method to define the binding region within NET1 to UNC5h2. The receptor UNC5h2 was coupled to a CM5 chip. The analyte NET1 as well as different chimera proteins were passed in a serial dilution from 30 nM, 100 nM and 300 nM over the coupled chip. SPR graphs confirm the observations from the solid-phase binding assay.

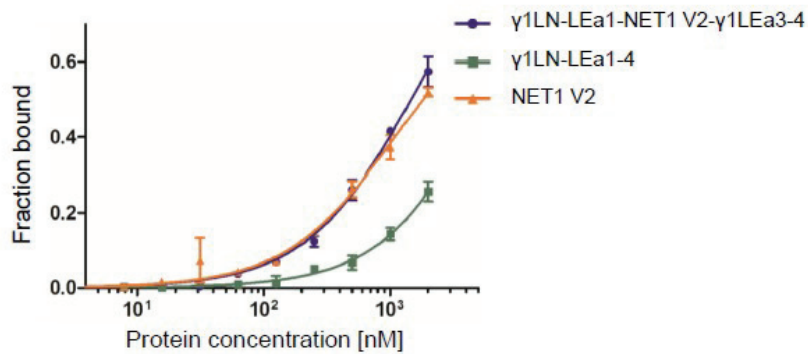
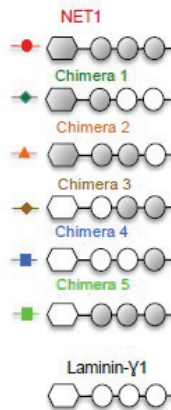
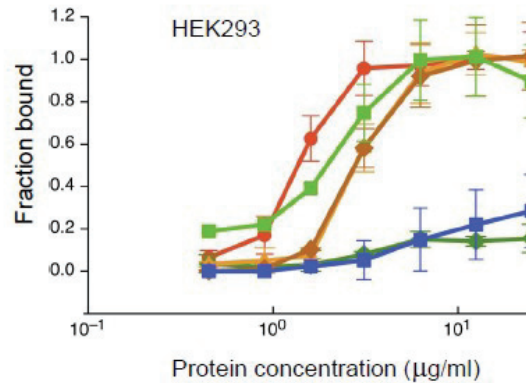
A**B****C**

Figure S4 Grandin et al.

Figure S4. Related to Figure 3. Determination of cell binding to NET1. (A) Binding studies of laminin gain of affinity for UNC5h2 by insertion of NET1 domain. (B) The cartoon represents different NET1 chimeras (C) Graph displays a cell adhesion assay in which NET1 as well as different chimera proteins are used as substrate for HEK293 cells. The adhesion assays show that chimera comprising the NET1 subdomain V-2 (Chimera 2, 3, and 5) mediate cell adhesion of HEK293 cells, whereas chimeras missing the subdomain V-2 (Chimera 1 and 4) do not.

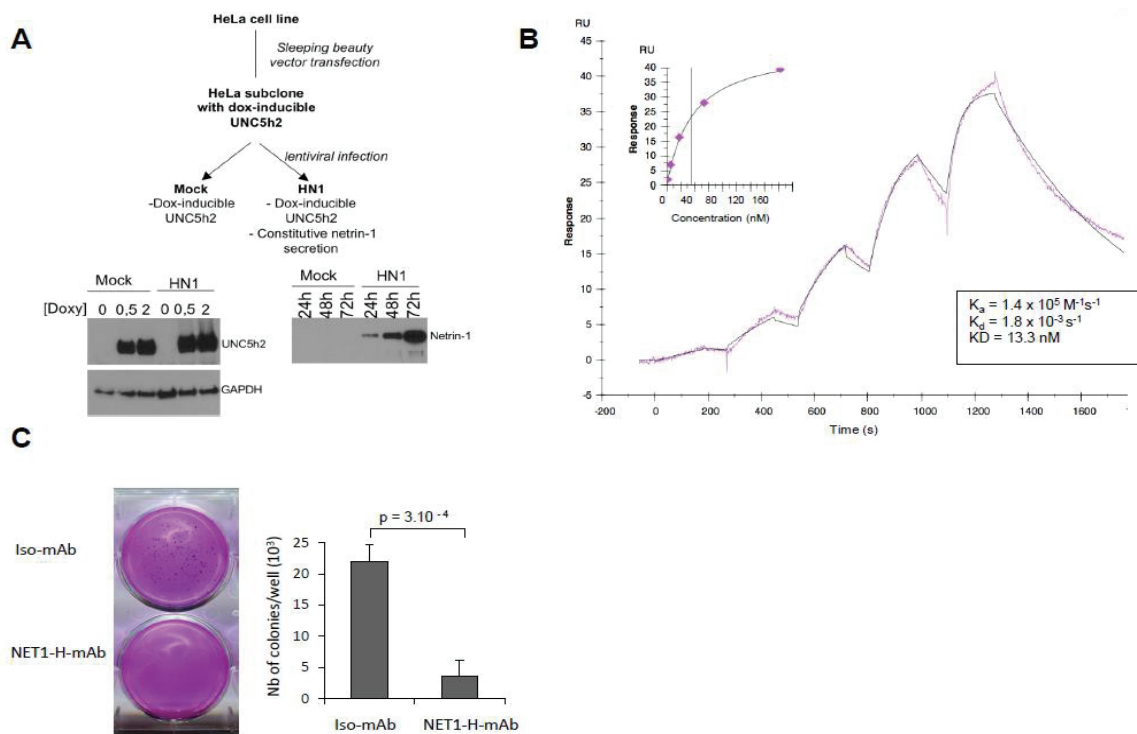


Figure S5 Grandin et al.

Figure S5. Related to Figures 3, 5 and 6. (A) Generation of a sleeping beauty-based HeLa cells expressing UNC5h2 and/or Netrin-1. Upper panel describes the generation procedure of the 2 HeLa subclones, Mock and HN1. Lower left panel shows western- blot analysis of 24h doxycycline- UNC5h2 induced expression is revealed by an anti 6xHIS tag antibody and anti-GAPDH is used as a loading control. On lower right panel, Netrin-1 secretion is monitored by western-blot analysis of Mock or HN1 supernatants collected at various time after cell seeding. (B) Biacore binding kinetic analysis of NET1-H-mAb on Netrin-1. SPR sensograms for the interaction of NET1-H-mAb and Netrin-1 were analysed on the Biacore T100 using single cycle kinetics. The antibody was immobilised on the sensor chip and various concentrations of antigen injected over the surface in a single cycle. Due to 'stickiness' of Netrin-1 to the chip itself, high concentrations of salt (600 mM NaCl) had to be used to measure specific binding to the mAbs. The sensograms from these injections are shown as coloured lines. Models of binding were fitted to this data (black lines) and the association rate (k_a), dissociation rate (k_d) and equilibrium dissociation constant (k_D) were determined for these interactions. (C) Soft agar assay for colony formation count in HL60 cells treated with 10μg/ml of either Iso mAb or the NET1-H-mAb. Representative crystal violet staining image is shown ; p-values, two- tailed unpaired Student's t test.

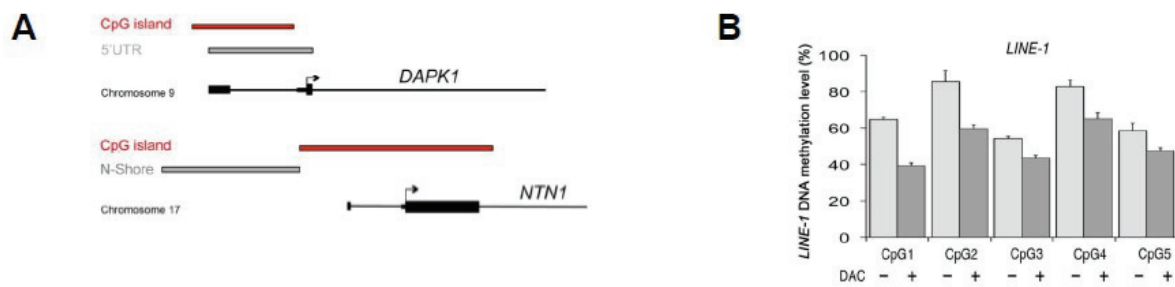


Figure S6 Grandin et al.

Figure S6. Related to Figures 6 and 7. DNA methylation profiles changes after DAC treatment in H460 cells. (A) Schematic representation of *DAPK1* and *NTN1* promoters, red bars indicate the CpG island, grey bars the area selected for TCGA DNA methylation analysis and light grey bars indicate the areas selected for pyrosequencing, respectively. **(B- D)**, Pyrosequenced CpG at LINE-1 sequences

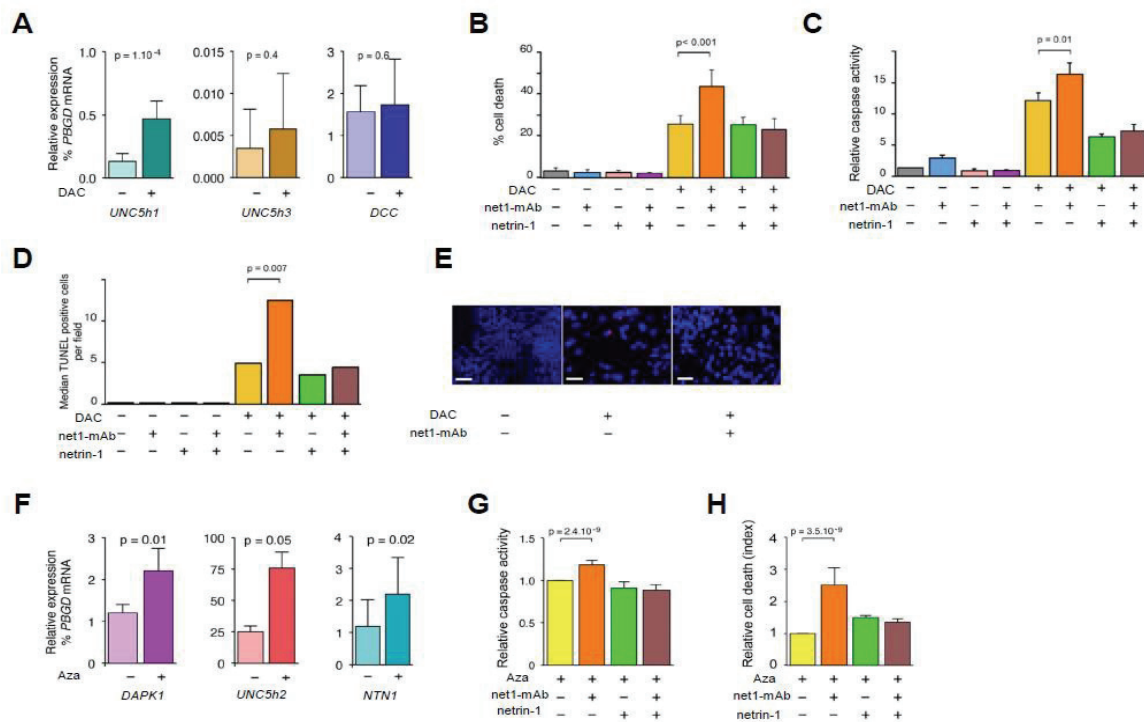


Figure S7 Grandin et al.

Figure S7. Related to Figure 7. *UNC5B* specific DR pathway is responsible of the apoptosis induction after demethylating agent + net1-mAb treatment, *in vitro*. (A) Other *NTN1* dependence receptors expression in H460 cells. Gene expression was measured by Q-RT-PCR after 72 hr in cells treated daily with 10 μM decitabine (DAC); *PBGD* expression level was used as internal control. SEM corresponding to the mean values from at least 3 independent experiments are shown, p-values, two-tailed unpaired Student's t test. (B - E) Cells were treated with decitabine (DAC, 10 μM, 72h), and/or net1-mAb (10 μg/mL, 48h) and/or recombinant netrin-1 (5 μg/mL, 48h). Cellular mortality (B) and caspase-3 activities (C) were determined in 3 independent experiments, Error bars, SEM; p-values, two-tailed unpaired Student's t test. (D) TUNEL from 3 independent experiments; p-values, Mann Whitney test. (E) Representative images of TUNEL, bars represent 50 μm. (F) Effects of azacytidine treatments on *DAPK1*, *UNC5B* and *NTN1*, *in vitro*. Gene expression was measured by Q-RT-PCR after 72 hr in cells treated daily with 2 μM azacytidine (Aza); *PBGD* expression level was used as internal control. SEM corresponding to the mean values from at least 3 independent experiments are shown, p-values, two-tailed unpaired Student's t test. (G) Cells were treated with azacytidine (Aza, 2 μM, 72h), and/or Net-H-mAb (10 μg/mL, 48h) and/or recombinant netrin-1 (5 μg/mL, 48h). Caspase-3 activities (G) and cellular mortality (H) were determined in 3 independent experiments, Error bars, SEM; p-values, two-tailed unpaired Student's t test.

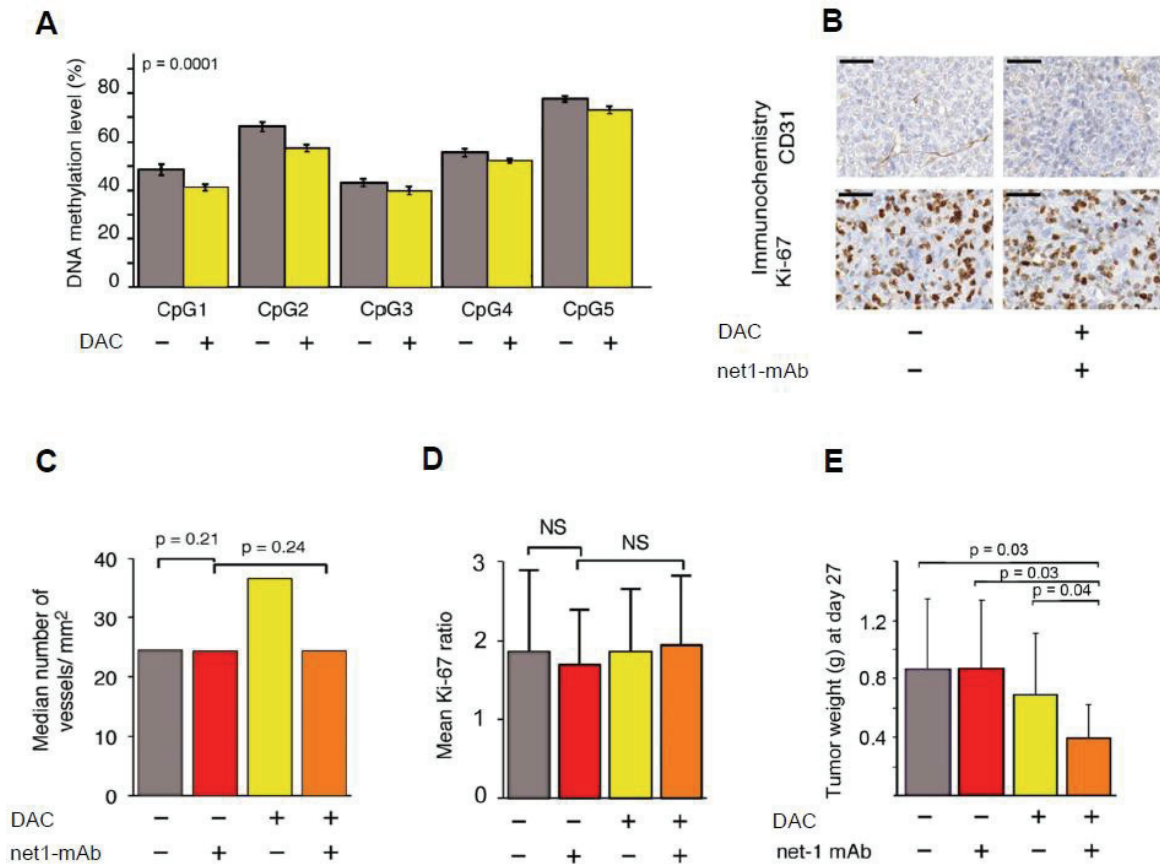


Figure S8 Grandin et al.

Figure S8. Related to Figure 8. DNA methylation, angiogenesis and proliferation *in vivo*. (A) LINE-1 pyrosequencing of H460 xenografted tumors arising from mice treated or not with DAC. (B-D) Tumor xenografts were fixed in formalin, paraffin embedded, sliced into 4 μm sections. (B) Representative sections corresponding to (C) and (D), bars represent 50 μm . Levels of vessels (C), and cell proliferation (D) were measured by immunohistochemistry staining using CD31 and KI67 antibodies from 4 independent tumors per treated groups, and expressed as percentage of total tumor surface or ratio between proliferative and non-proliferative cells; p values, Mann Whitney test. (E) Tumor weights were measured 3 days after the end of the treatments. Statistical significance of differences between groups was determined by two-tailed unpaired Student's t test. Error bars, SEM.

Table S1. Related to Figure 1. Data collection, phasing and refinement

| | Native 1 | $\lambda 1$ (peak) | $\lambda 2$ | $\lambda 3$ (remote) |
|---|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Data Collection | | | | |
| Wavelength (Å) | 1.2544 | 1.2547 | 1.2552 | 1.2410 |
| Resolution a*,b* (Å) | 44.85-2.8 (2.90-2.80) | 44.74-3.47 (3.58-3.47) | 44.76-3.48 (3.59-3.48) | 48.95-3.52 (3.64-3.52) |
| Resolution c* (Å) | 44.85-2.64 (2.74-2.64) | same as a* | same as a* | same as a* |
| R _{meas} ^a | 0.133 (1.344) | 0.209 | 0.168 (0.536) | 0.196 |
| I/σI | 8.9 (2.0) | 4.2 (2.0) | 4.8 (2.0) | 4.5 (2.0) |
| Ellipsoidal Completeness | 1.000 (1.000) | - | - | - |
| Spherical Completeness | 0.896 | 0.994 (1.000) | 0.995 (0.999) | 0.995 (1.000) |
| Mean Redundancy | 10.6 (10.8) | 4.2 (3.9) | 4.2 (3.9) | 4.1 (4.0) |
| Cell dimensions a=b,c (Å) | 69.75, 334.80 | 69.70, 333.26 | 69.72, 333.37 | 69.84, 333.39 |
| α,β,γ (°) | 90,90,120 | 90,90,120 | 90,90,120 | 90,90,120 |
| Phasing | | | | |
| Figure-of-merit ^b (acentric/centric) | 0.296/0.292 | | | |
| Initial map vs final model ^c | 0.41 | | | |
| Refinement | | | | |
| Resolution | 44.85-2.64 | | | |
| Number of reflections | 25768 (1308) ^d | | | |
| R _{work} (%) ^e / R _{free} (%) | 24.6/ 29.4 | | | |
| Mean B-factors (Å²) | | | | |
| Protein/Ca ²⁺ /Cl ⁻ /H ₂ O | 52.9/38.8/19.8/37. | | | |
| Glycan at Asn ⁹⁵ | 72.68 | | | |
| Glycan at Asn ¹¹⁶ | 94.71 | | | |
| Glycan at Asn ¹³¹ | 96.75 | | | |
| R.M.S.D. | | | | |
| Bond length (Å) | 0.014 | | | |
| Bond angles (°) | 1.697 | | | |
| Ramachandr An | | | | |
| Favoured (%) | 81.4 | | | |
| Allowed (%) | 18.6 | | | |
| Disallowed (%) | 0.0 | | | |

Statistics for the anomalous datasets ($\lambda 1$ - $\lambda 3$) applies to separate Friedel mates I⁺/I⁻.

Numbers in parantheses represent the values for the highest ellipsoidal (Native 1) or spherical (λ_1 - λ_3) resolution shell.
 R.M.S.D. root mean square deviations

$$^a = \frac{\sum_{\mathbf{h}} (\bar{I}_{\mathbf{h}})^2 \sum_{i=1}^N |I_{(i\mathbf{h})} - I_{\mathbf{h}}|}{\sum_{\mathbf{h}} \sum_{i=1}^N I_{(i\mathbf{h})}}$$

where N is the number of redundant observations for reflection \mathbf{h} ,

$\bar{I}_{\mathbf{h}}$ the mean intensity of reflection \mathbf{h} , and $I_{(i\mathbf{h})}$ the intensity of a redundant observation i for reflection \mathbf{h} .

^bFigure of merit from 48.95 to 3.47 Å.

^cAveraged cosines of phase differences between initial map and phases generated from the final model from 44.85 to 2.64 Å.

^dNumber of reflections in free set (5.1%)

^e $R_{\text{work}} = \sum_{\mathbf{hkl}} |F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}| / \sum_{\mathbf{hkl}} |F_{\text{obs}}|$.

^fcalculated using SwissModel and Procheck (Gasteiger et al., 2003; Laskowsky, 1993)

Table S2. Related to Figure 1. Data collection for S-SAD

| | S-SAD 1 | S-SAD 2 | S-SAD 3 | S-SAD 4 | S-SAD 5 |
|--|--|---------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Data Collection | | | | | |
| Wavelength (Å) | 1.69950 | 1.69950 | 1.90745 | 1.90745 | 1.90745 |
| Resolution (Å) | 59.27-4.0 (4.22-4.00) | 59.40-3.90 (4.11-3.90) | 66.96-3.50 (3.83-3.50) | 60.03-3.20 (3.42-3.20) | 60.07-3.20 (3.42-3.20) |
| R _{meas} ^a | 0.192 (0.482) | 0.152 (0.352) | 0.279 (0.889) | 0.209 (0.874) | 0.198 (0.864) |
| I/σI | 15.2 (7.7) | 19.3 (10.4) | 7.6 (2.8) | 7.2 (2.2) | 8.3 (2.6) |
| Completeness | 1.00 (1.00) | 0.990 (0.995) | 1.00 (1.00) | 1.00 (1.00) | 1.00 (1.00) |
| Redundancy | 11.6 (11.5) | 11.6 (11.5) | 7.4 (7.5) | 4.9 (5.0) | 6.7 (6.9) |
| Cell dimensions a=b,c (Å) | 69.54, 334.85 90,90,120 | 69.7, 335.4 90,90,120 | 69.45, 334.81 90,90,120 | 69.32, 334.75 90,90,120 | 69.36, 334.71 90,90,120 |
| Phasing | | | | | |
| Number of DSB ^b | 17 | | | | |
| Number of | 6 | | | | |
| Number of Ca ²⁺ | 1 | | | | |
| Figure-of-merit for S-SAD 1-5 | 0.300/0.173 | | | | |
| Figure-of-merit ^c (Initial map vs final model) | 0.48 | | | | |
| Hand Score | | | | | |
| Correlation on E ² / Contrast of density | 3.25 (P3 ₂ 21) 1.57 (P3 ₁ 21) | | | | |

Statistics for the anomalous datasets (S-SAD1-5) applies to separate Friedel mates I⁺/I⁻. Numbers in parantheses represent the values for the highest resolution shell.

$$a = \frac{\sum_{\mathbf{h}} \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N |I_{(ih)} - \bar{I}_{(h)}|}{\sum_{\mathbf{h}} \sum_{i=1}^N I_{(ih)}} \text{---where } N \text{ is the number of redundant observations for reflection } \mathbf{h},$$

$\bar{I}_{(h)}$ the mean intensity of reflection \mathbf{h} , and $I_{(ih)}$ the intensity of a redundant observation i for reflection \mathbf{h} .

^bDSB Disulfide bridges

^cAveraged cosines of phase differences between initial map and phases generated from the final model from 44.85 to 2.64 Å.

Table S3. Related to Figure 4. List of mutants of AP-conjugated netrin-1. The amino acids mutated in the V-2 domain of netrin-1 are underlined.

| Mutations | Partial sequence of the mutated AP-netrin-1 |
|---------------------|---|
| NET1 (wild type) | ARRCRFNMELYKLSGRKSGGVC |
| R348L, R349L, R351L | <u>ALLCL</u> FNMELYKLSGRKSGGVC |
| N353A | ARRCRF <u>A</u> MELYKLSGRKSGGVC |
| E355Q | ARRCRFNM <u>Q</u> LYKLSGRKSGGVC |
| Y357F | ARRCRFNMEL <u>F</u> KLSGRKSGGVC |
| K358L | ARRCRFNMELY <u>L</u> LSGRKSGGVC |
| S360A | ARRCRFNMELYKL <u>A</u> GRKSGGVC |

Table S4 Related to Experimental Procedures

Q-RT-PCR Primers

PBGD Forward 5'-GAGTGATTCGCGTGGGTACC-3'
Reverse 5'-GGCTCCGATGGTGAAGCC-3'

GAPDH Forward 5'-CGGAGTCAACGGATTTGGTCGTAT-3'
Reverse 5'-AGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGAC-3'

DAPK1 Forward 5'-GATAGAAATGTCCCCAAACCTCG-3'
Reverse 5'-TCTTCTTGGATCCTTGACCAGAA-3'

UNC5H2 Forward 5'-CCCGCCACACAGATCTACTT-3'
Reverse 5'-CAGTAATCCTCCAGCCCAA-3'

NTN1 Forward 5'-TGCAAGAAGGACTATGCCGTC-3'
Reverse 5'-GCTCGTGCCCTGCTTATACAC-3'

MBD2 Forward 5'-CCCACAACGAATGAATGAACAGC-3'
Reverse 5'-TGAAGACCTTTGGGTAGTTCCA-3'

UNC5H1 Forward 5'-ATCACCAAGGACACAAGGTTTGC-3'
Reverse 5'-GGCTGGAATTATCTTCTGCCGAA-3'

UNC5H3 Forward 5'-GCAAATTGCTGGCTAAATATCAGGAA-3' Reverse
5'-GCTCCACTGTGTTTCAGGCTAAATCTT-3'

DCC Forward 5'-AGCCAATGGGAAAATTACTGCTTAC-3'
Reverse 5'-AGGTTGAGATCCATGATTTGATGAG-3'

NEO1 Forward 5'-TGGAAAACCAACTCCAACGTGA-3'
Reverse 5'-TGATTTACCAGACCCAAAACCTTGA-3'

Pyrosequencing

Amplification primers

LINE-1 Forward 5'-TAGGGAGTGTTAGATAGTGG-3'
Reverse 5'-AACTACRAACTACAATAAC

GAPDH

unmodified Forward 5'-CTCTTGCTACTCTGCTCTGG-3'
Reverse 5'-GCTAAGTTTAGCCTGCCTGG-3'

GAPDH bisulfite

treated Forward 5'-GTATTTGTTGATGGGTTAAGG-3' Reverse
5'-ATAAAAACAATCCCCTACCC-3'

Sequencing primers

LINE-1-a 5'-CAAATAAACAATACCTC-3'

2.1.2 Supplemental References

Gasteiger, E., Gattiker, A., Hoogland, C., Ivanyi, I., Appel, R. D., and Bairoch, A. (2003). ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res* 31, 3784-3788.

Laskowsky, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S. & Thornton, J. M. (1993). PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures.

2.2 Papier n°2 : L'inhibition de la méthylation de l'ADN favorise la sensibilité des tumeurs mammaires à l'interférence à la nétrine-1.

Mélodie Grandin, Guillaume Devailly, Yannick Bidet, Pauline Mathot, Akram Ghantous, Benjamin Gibert, Nicolas Gadot, Isabelle Puisieux, Zdenko Herceg, Jean-Guy Delcros, Agnès Bernet, Patrick Mehlen, Robert Dante

2.2.1 Préambule

Pour ces travaux, nous nous sommes intéressés aux profils d'expression des trois principaux médiateurs de l'apoptose via UNC5B : NTN1, UNC5B et DAPK1. Dans des cohortes de tumeurs mammaires, nous avons pu montrer que dans un taux assez important des tumeurs, on observe à la fois une diminution des protéines nétrine-1 et DAPK1. Cette perte concomitante d'expression a également été validée sur l'expression génique par séquençage des ARN de la cohorte mammaire de The Cancer Genome Atlas. De plus, ces baisses d'expressions sont corrélées à une hyperméthylation au niveau du promoteur de ces deux gènes. Dans ce cas présent, l'hypothèse formulée est que les cellules tumorales n'ont que peu pas de ligand à proximité, mais ne peuvent entrer en apoptose via UNC5B car son partenaire pro-apoptotique DAPK1 est lui aussi absent. Dans ce contexte, traiter les tumeurs avec des anticorps bloquant l'interaction ligand/ récepteur est inutile puisque cela ne pourra pas transduire de signal apoptotique. Néanmoins, l'hyperméthylation du promoteur d'un gène est un phénomène réversible, et l'utilisation de la décitabine afin de réactiver cette voie apoptotique par déméthylation semble représenter une approche judicieuse pour resensibiliser les cellules tumorales à la mort induite via le récepteur UNC5B, en absence de ligand ou lorsque ce dernier est bloqué par un anticorps. Voilà le préambule de cette histoire.

2.2.2 Abstract

Netrin-1 (NTN1), a secreted protein, has recently raised interest in the cancer arena. In a substantial part of human cancers, *NTN1* up-regulation is inhibiting apoptosis induced by its so-called dependence receptors DCC and UNC5H and thus promotes tumor progression. However, in other cancers, the selective inhibition of this dependence receptor death pathway relies on the silencing of pro-apoptotic effector proteins. We show here that a large fraction of human breast tumors exhibits simultaneous DNA methylation-dependent loss of expression of *NTN1* and of *DAPK1*, a serine threonine kinase known to transduce the netrin-1 dependence receptor pro-apoptotic pathway. The inhibition of DNA methylation by drugs such as decitabine in netrin-1-low cancer cells restores the expression of both *NTN1* and *DAPK1*. Consequently, the combination of decitabine with *NTN1* silencing strategies or with an anti-netrin-1 neutralizing antibody potentiates tumor cell death and efficiently blocks tumor growth in different animal models. Thus, combining DNA methylation inhibitors with netrin-1 neutralizing agents may be a valuable strategy for combating cancer.

2.2.3 Introduction

A recent attention was given to a specific functional family of receptors that may constrain cancer progression. These receptors are dubbed dependence receptors (DR). In contrast to most cellular receptors, a dual role characterizes these transmembrane receptors: in presence of their respective ligand, they provide a classic positive signal, while the absence of ligand triggers a cascade of signaling events leading to apoptotic cell death. This protein family has grown and now includes more than twenty members. Netrin-1, a DR ligand represents the first attractive axon guidance cue described in the early nineties and that has now been shown to display many biological functions [336], [266], [306]. Netrin-1 receptors are Deleted in Colorectal Carcinoma (DCC), Uncoordinated-5-Homologs (UNC5H1-4/A-D) and Neogenin. The ability of these receptors to trigger apoptosis in settings of ligand

limitation has been shown to be a constrain for tumor progression, and as such inactivation of *UNC5C*, *DCC* or mutation of *DCC*-inducing apoptosis domain is associated with tumor development and progression in mouse models [337], [239]. In line with these observations, *DCC* and *UNC5H* are silenced either by loss-of-heterozygosity or epigenetic mechanisms [338, 287], [339] in many cancers. Alternatively, in some other cancers, an up-regulation of *NTNI* provides a similar tumor growth selective advantage by abolishing their dependency on netrin-1 availability in the micro-environment [240]. This gain of netrin-1 may represent an opportunity for therapeutic intervention: disrupting the netrin-1 binding to its receptors should induce apoptotic cell death *in vitro* and tumor growth inhibition *in vivo*. Along this line, silencing of netrin-1, or biologics interfering with netrin-1/DRs interaction have been shown to efficiently reduce tumor growth and metastasis in different animal models [290], [288, 340], [286]. This has been shown in different model. An anti-netrin-1 antibody is under preclinical evaluation and should be assessed in early clinical trial in 2016.

Nevertheless, a substantial fraction of human tumors appears to conserve the expression of netrin-1 receptors without gaining *NTNI* expression, suggesting that the DR pro-apoptotic pathways are altered [339], [341, 337]. In cancers, epigenetic modifications are frequently associated with increased expression of anti-apoptotic proteins and inactivation of members involved in apoptosis induction [342]. Along this line, previous works have shown that DAPK1, a serine threonine kinase responsible for *UNC5H*-induced apoptosis [278], [280], is downregulated in various cancers [320], [343], [344]. Furthermore mechanistic analyses demonstrated a direct relationship between the hypermethylation of the CpG island (CGi) located at *DAPK1* promoter region and its downregulation [320], [343], [344], [341]. Finally, decitabine (5-aza-2'-deoxycytidine, DAC) treatment inhibits DNA methylation of *DAPK1* promoter and restores DAPK1 expression in lung cancer cell lines [345].

Inhibition of DNA methylation seems to be a promising tool for combating cancer [346], [347], [166], [198]. Decitabine showed anti-leukemic effects in several clinical trials and has been

approved by FDA for the treatment of myelodysplastic syndromes and recent studies indicated that decitabine shows some effects in preclinical models [198]. An alternative to mono-therapeutic strategies could be to take advantage of the impact on gene transcription mediated by DNA methylation inhibition. We report here that inhibition of DNA methylation by decitabine restores the pro-apoptotic machinery linked to the netrin-1 dependence receptor death signaling in breast cancer cell lines and patient derived xenografts. We thus provide evidence that combining decitabine with a netrin-1 neutralizing antibody empowers tumor cell death *in vitro* and tumor growth inhibition in mice.

2.2.4 Results

2.2.4.1 Epigenetic downregulation of netrin-1 is associated with the epigenetic downregulation of *DAPK1* in human breast cancers.

While we and others have previously shown that netrin-1 (NTN1) is up-regulated in some cases of aggressive breast cancer and in breast metastasis [290], [291] we investigated whether the death signaling observed upon netrin-1 limitation could be switch-off on netrin-1 low breast tumors. Of interest DAPK1 which has been shown as the main mediator of UNC5B-induced apoptosis, has been frequently shown as epigenetically silenced in various cancers including breast tumors [348], [349]. We thus looked at respective expression of netrin-1, UNC5B and DAPK1 in a cohort of 70 patients with breast ductal carcinoma. The immunohistochemistry analysis revealed, that, in the samples exhibiting a low level of netrin-1, DAPK1 was also expressed at low level (χ^2 test, $P = 0.04$) (Fig 1A and B). In contrast, UNC5B expression levels were equally distributed in both netrin-1-low and netrin-1-high groups (Fig 1A and B). This result was also validated in the 737 samples of TCGA cohort of breast tumors, where we observed a correlation between *DAPK1* and *NTN1* expression (Odd Ratio = 4.71, $P = 0.03$, Supplementary Fig S1A).

Because DAPK1 expression was known to be regulated by promoter methylation, we examined differentially methylated regions (DMRs) associated with oncogenic transformation by Illumina's

HumanMethylation450K Array (HM450) and RNASeq data from TCGA breast cohort (N = 76) corresponding to paired tumor-normal breast cancer samples. Comparison of DNA methylation level of each 5' end probes of *NTN1* (-765 and 1300 from the transcription start site (TSS), respectively) and *DAPK1* (365 and 838 from TSS, respectively) in normal vs cancer samples indicated that these regions were hypermethylated (threshold = 2) in about 30% of the cancer samples when compared with their corresponding paired normal tissues (Fig. 1C and 1F). Furthermore, *NTN1* was downregulated (Fig. 1D, fold change (FC) ≥ 2) in 43% of cases and the “*NTN1*-low” samples were hypermethylated (Fig. 1E; $P = 3.10^{-2}$, two-sided Mann Whitney test) when compared with samples exhibiting no *NTN1* downregulation (FC ≥ 1.3). Using the same approach for *DAPK1*, we observed that samples exhibiting *DAPK1* downregulation (29% of the samples, Fig. 1G) were also hypermethylated ($P = 3.10^{-4}$) when compared with the other samples (Fig 1D-1F). These epigenetic modifications did not seem to be independent events since in *NTN1*-hypermethylated samples (N =23, FC ≥ 2) *DAPK1* was also hypermethylated (mean FC = 2.22), while *NTN1*-hypomethylated samples (N = 13, FC < 0.7) were not hypermethylated at *DAPK1* (mean FC = 0.93). The relationship between DNA hypermethylation was also observed in a larger TCGA breast cohort (N = 737), where the mean percentages of CpG methylation (Supplementary Fig S1A and B) at *DAPK1* and *NTN1* were inversely correlated with their expression levels (Pearson's $r = -0.32$, $P < 10^{-18}$ and Pearson's $r = -0.14$, $P = 6.6.10^{-5}$, respectively), suggesting that DNA methylation represses *DAPK1* and *NTN1* transcription in human breast tumors.

In order to set up an experimental model, DNA methylation patterns of two cancer cell lines were determined by parallel sequencing of methylated DNA fragments selectively pulled-down with a recombinant protein containing the Methyl-CpG-binding domain of MBD2 (Methyl-Cap-seq), the MDA-MB-231 cell line derived from human breast cancer, and the HMLER cell line constructed from *in vitro* transformation of human mammary cells [350], [351]. Data obtained indicated that the 5' end CpG islands of *DAPK1* and *NTN1* were methylated in the two cancer cell lines (Fig 2A), In addition, hypermethylation at the *NTN1*-CGi and *DAPK1*-CGi are present across the panel of ENCODE cell

lines, but only in those derived from tumor cells, suggesting that *NTNI* and *DAPKI* CGi hypermethylation is linked to the transformation process. The methylation of *UNC5B* was not analyzed further since its 5' end CGi was unmethylated in all cell lines studied (Fig 2A). For both genes, a region located at the 3' end of the CGis (Fig 2A, light gray boxes) was selected for quantitative analysis of DNA methylation by bisulfite pyrosequencing. The analysis of breast cancer samples (tumor bank - Centre Léon Bérard) indicated that the mean percentages of CpG methylation at *DAPKI* and *NTNI* pyrosequenced regions were inversely correlated (Pearson's $r = -0.66$, $p = 0.003$, and Pearson's $r = -0.55$, $p = 0.008$, respectively) with their expression levels (Supplementary Fig 1D-E).

To further study the link between netrin-1 DR pathway gene expression and DNA methylation, we assessed MDA-MB-231 and HMLER cells for *DAPKI*, *UNC5B* and *NTNI* expression upon decitabine (DAC).

Parallel sequencing of PCR fragments from both cell lines indicated that DAC treatment efficiently demethylated these genes and clusterization of the sequenced amplicons according to their methylation patterns indicated that this hypomethylation was not randomly distributed but corresponded to a mixture of fully demethylated molecules and unaffected molecules (Supplementary Fig. S1F-G). Inhibition of DNA methylation by DAC treatment (Fig. 2B and 2C) resulted in a significant up-regulation of both *DAPKI* and *NTNI* mRNA in MDA-MB-231 and HMLER (Fig 2D-E).

Altogether these data suggest that the epigenetic regulation of both *NTNI* and *DAPKI* is a general mechanism in human breast cancers. Parallel sequencing of DMRs (Fig 2A, dark gray boxes) validated their methylation status deduced from MeDP-seq experiments and indicated that DAC treatments efficiently reduced by half their methylation level, *in vitro* (Fig 2D and 2E). Upon decitabine treatment, it has to be noted that *UNC5B*, which promoter was not methylated in the tested cell lines, was up-regulated in MDA-MB-231 but not in HMLER (Fig 2B and 2C) suggesting indirect regulatory mechanisms. In addition, this up-regulation did not seem to be a general feature of netrin-1 specific receptors since *UNC5A*, *UNC5C* and *DCC* were expressed at a very low level,

(Supplementary Fig 2A and 2B). Altogether these support the view that DNA hypermethylation is involved in the transcriptional silencing of *DAPK1* and *NTN1* in human breast cancer cells.

2.2.4.2 Decitabine resensitizes cancer cells to netrin-1 interference *in vitro*.

We thus hypothesized that pharmacological targeting of the DNA methylation machinery may re-establish a functional netrin-1 receptors pro-apoptotic pathway, and thus resensitizes cells to netrin-1 interference. To address this question, we investigated whether *DAPK1* forced expression in the *DAPK1*-negative HMLER cells may reestablish the apoptosis induction (Supplementary Fig S2C). As expected, an increase of caspase-3 activity was observed in *DAPK1* transfected cells. Furthermore, this apoptosis induction was partially reversed by addition of recombinant netrin-1 (Supplementary Fig S2C and S2D). We thus analyzed cell death both by viability assay or caspase-3 activity assay in HMLER transfected with *NTN1* siRNA and treated with decitabine. While transfections had a mild effect on HMLER *per se*, treatment with decitabine strongly potentiated the netrin-1 deprivation-induced cell death (Supplementary Fig S2F - S2H).

To move toward therapeutic perspective, we assessed the effect of combining decitabine with a fully human anti-netrin-1 antibody, net1-mAb, which has been shown to have promising pre-clinical anti-cancer effect [340]. MDA-MB-231 and HMLER were treated with decitabine or net1-mAb, or a combination of both drugs. As anticipated, the cell lines were resistant to net1-mAb alone. In contrast, as expected [352], [347], decitabine induced some degrees of apoptotic cell death of the tested cell lines, as evidenced by DNA fragmentation (Fig 3A) and viability assays (Fig 3B). Addition of net-1 mAb to decitabine-treated cells significantly enhances apoptosis (Fig 3A and B). This increased cell death was moreover blocked by the concomitant addition of recombinant netrin-1 in excess (Fig 3A and B), further supporting the view that net-1 mAb induced cell death was specifically linked to netrin-1 neutralization. Moreover, the pro-apoptotic activity of treatment combining net-1 mAb and decitabine, was not linked to an intrinsic property of decitabine. Treatment of the MDA-MB-231 and HMLER cell lines with the 5-azacytidine, a DNA methylation inhibitor, led to similar modifications of

gene expression and similar cell death effect when combined with the netrin-1 mAb (Supplementary Fig S3).

2.2.4.3 The combination of the netrin-1 neutralizing antibody with decitabine inhibits tumor growth in mice models.

We next investigated whether the inhibition of DNA methylation could also re-establish the netrin-1 receptor-pro-apoptotic pathway *in vivo*. Nude mice were engrafted with MDA-MB-231 in mammary fat pad as an orthotopic site for breast cancer. When tumors were palpable ($\approx 100 \text{ mm}^3$), DAC was subcutaneously injected at a therapeutic dose (0.5 mg/kg). Parallel sequencing of amplicons at *DAPK1* and *NTN1* CGIs indicated that these genes were also hypomethylated (ranging from 5% to 27% depending of the CpG analyzed) in DAC-treated mice (Fig 3C). DAC treatments were associated with re-expression of *DAPK1*, netrin-1 and *UNC5B* as measured by immunohistochemistry (IHC) performed on tumor sections (Fig 3D and E).

To evaluate the effect on tumor growth, MDA-MB-231 orthotopic xenografts were performed, and mice were treated by intra-peritoneal injections of net-1 mAb, or subcutaneous injection of therapeutic doses (0.5 mg/kg) of decitabine, or a combination of both treatments for a period of 21 days (Fig 3 F and G). While no significant difference was observed between the control groups and mice treated either with net-1 mAb or decitabine alone, the combination of both drugs strongly inhibited tumor growth (Fig 3F) and tumor weights (Fig 3G) when compared with the control groups. Furthermore, similar results were obtained using the NET-1-mAb antibody that is scheduled for administration to human in 2016 [340], (Supplemental Fig S4A). Of interest, the tumor growth inhibition effect of the combination was associated with marked increased of tumor cell death (Supplemental Fig S4 B and C).

In order to get further insights on the mechanisms involved in tumor suppressive activity of netrin-1 neutralization upon decitabine treatment, cancer cell proliferation and tumor angiogenesis were analyzed in treated tumors. A small reduction of the proliferative rate was detected in MDA-MB-

231-xenografts from mice treated with decitabine, the differences between treated samples and controls were not statistically significant (Supplementary Fig 5A and B). Staining of sections from MDA-MB-231-xenografts with an antibody directed against CD31 (also known as platelet endothelial cell adhesion molecule) indicated that the anti-netrin-1 antibody treatment led to a reduced angiogenesis, which could be related to the fact that netrin-1 has been described to be implicated during angiogenesis [305]. However, no statistically significant differences were observed between mice treated with the anti-netrin-1 antibody alone (where no tumor growth inhibition was detected) and the mice treated with a combination of decitabine and anti-netrin-1 antibody where tumor growth was profoundly affected (Supplementary Fig 5A). Thus, the tumor growth inhibiting effect of the combination decitabine/netrin-1 mAb is not due to change in proliferation or in angiogenesis but more probably related to apoptosis induction. Finally, the netrin-1 neutralization upon decitabine treatment reduced metastasis development in mouse model constructed from MDA-MB-231 cells carrying a luciferase-base vector (MDA-MB-231-luc) injected in the tail vein of nude mice (Supplementary Fig 5C- 5E).

To move toward a model closer to the human pathology, we analyzed the effect of combining decitabine and the netrin-1 antibody in mice model bearing a patient derived tumor (PDX model). As observed for cell lines engrafted in mice, DAC treatments induced *DAPK1* and *NTN1* hypomethylation in tumors (Fig 4A) and stimulated *DAPK1*, *UNC5B*, and netrin-1 expression and (Fig 4B). Furthermore, immunohistochemistry staining on tumor sections indicated that combination of DAC + net-1 mAb induced an increased rate of apoptotic (Fig 4C and D), while the combination failed to be associated with change in tumor cell proliferation or angiogenesis (Supplementary Fig S6A and B). Similarly to the data obtained in MDA-MB-231 engrafts, combined treatment strongly impact on tumor growth while the monotherapies showed no effects (Fig 4E).

2.2.4.4 Tumor growth inhibition induced by combining decitabine with netrin-1 interference is directly mediated by UNC5B and DAPK1.

The potential reversibility of epigenetic DNA modifications raised the possibility that inhibition of DNA methylation might induce the reexpression of these genes, and thus, resensitized cells to several pathways resulting in apoptosis. We studied by high-throughput sequencing of poly-adenylated RNA (RNAseq) gene reexpression upon decitabine treatment in different MDA-MB-231 and HMLER cell lines. Indeed, the 626 common upregulated genes upon DAC treatments (FC untreated/ treated cells >2) were investigated for their Gene Ontology terms and their KEGG pathways contributions by WEB-based GENE SeT AnaLysis Toolkit [353]. Enriched Gene Ontology terms were of various natures and included response to molecule of bacterial origin, response to lipopolysaccharide, biological regulation, cell proliferation, and cytokine activity. Enriched KEGG pathways included KEGG osteoclast differentiation, KEGG MAPK signaling pathway, KEGG rheumatoid arthritis, KEGG cytokine-cytokine receptor interaction, pathways in cancer, and NOD-like receptor signaling pathway (Supplementary Fig. S7). Gene upregulated upon DAC treatment belong to many biological functions, however, the profiles of transcriptomic changes did not suggested that another pro-apoptotic pathway(s) participated to the synergistic effect of netrin-1 mAb and DAC on cell death described here.

These data suggested that the tumor growth inhibiting effect observed by the combination mediated through the proapoptotic DR pathway and, thus, was per se due to the cell resensitisation to the net-1 mAb by decitabine. To further support this mode of action, we thus generated MDA-MB-231 cells stably expressing shRNAs targeting *DAPK1*, *NTN1*, or *UNC5B* transcripts. Q-RT-PCR analysis indicated that decitabine induced expression of *DAPK1*, *NTN1*, and *UNC5B* was efficiently counteracted by gene knock-down in the corresponding MDA-MB-231-shDAPK1, MDA-MB-231-shNTN1, and MDA-MB-231-shUNC5B cells (Fig 5A). We then investigated the responses of the MDA-MB-231-Luc-shRNA cells, when engrafted in mammary fat pad and treated or not with Decitabine and the net-1 mAb. After validating by IHC the *in vivo* absence of DAPK1, UNC5B and

NTN1 induction by decitabine treatment (Fig 5B - 5D), anti-active caspase-3 immunohistochemistries were performed on tumor sections, and revealed that silencing of DAPK1 or UNC5B fully prevent caspase-3 activation mediated by the combination DAC+ net1-mAb while decitabine alone showed a marked increase of caspase activation in monotherapy when netrin-1 was silenced. In agreement to the proposed mode of action, silencing of *DAPK1* or *UNC5B* mRNA prevents the tumor growth inhibition induced by the combination DAC+ net-1 mAb (Fig 5E – 5G). Along the same line, *NTN1* silencing was sufficient to provide a tumor growth inhibiting effect to decitabine single treatment (Fig 5H). Together, these data support the view that, DAPK1 and UNC5B are the key players to the response observed when combining decitabine and the anti-netrin-1 antibody.

2.2.5 Discussion

The current results provide the animal proof of concept that inhibition of DNA methylation can sensitize solid tumors to antibodies mediating tumor cell apoptosis. We have proposed that in netrin-1 low tumors, inhibition of the netrin-1 dependence receptor death pathway may occur, either by downregulation of the receptors or key signaling pathway partners in colorectal cancer and neuroblastoma [287], [354]. Of interest, in the breast cancer panel analyzed here, low *NTN1* expression is associated with hypermethylation of the CpG island located at the 5' end of this gene. Furthermore, this correlation between hypermethylation and gene silencing was also found for *DAPK1*, an essential partner in netrin-1 dependence receptor death pathway. These features were also recapitulated in breast cancer cell lines; *NTN1* was down-regulated and methylated in HMLER, and MDA-MB-231 cells, and *DAPK1* was methylated and downregulated in HMLER cells.

We show here, both *in vitro* and in xenograft models, that combining inhibition of DNA methylation with an anti-netrin-1 antibody is associated with the re-expression of netrin-1 and DAPK1, and leads to tumor cell death and tumor growth inhibition. The correlation between *NTN1* and *DAPK1* silencing and DNA hypermethylation does not exclude that their upregulation in DAC-treated cells might be dependent of additional factors. For example, *UNC5B*, while unmethylated, was

upregulated in DAC-treated MDA-MB-231 cells and, in breast cancer cells, the downregulation of some methylated genes is dependent on the deposition of the methyl-CpG binding domain protein 2 (MBD2) at their promoter sequence [66].

It is intriguing to see that in the present model, decitabine used as a mono-therapeutic agent only show modest if none tumor growth inhibitory effect. It is unlikely that the resistance to decitabine treatment, used as a mono-therapeutic agent, was the result of an over- or under-dosage since several reports have shown that similar decitabine doses are efficient in reducing tumor formation in some mouse models, including *Apc*^{Min}-induced intestinal neoplasia[198], HRAS-G12V-transformed human epithelial kidney, leukemia cells, breast cancer cell lines, and engrafted patient-derived tumors [341] [344]. Furthermore, DNA hypomethylation was observed upon decitabine treatment in MDA-MB-231 xenograft tumors and PDX, indicating that DNA methylation was efficiently inhibited by decitabine, *in vivo*. Alternatively, these data would suggest that tumor-growing conditions can overcome, at least partially, the anti-tumor effect of decitabine. Experimental approaches [211], [355], [356] and clinical trials (ClinicalTrials.gov <http://www.clinicaltrials.gov>) using combinations of decitabine with other epigenetic modifiers and/or cytotoxic agents provide interesting strategies for tumor growth reduction. However these approaches do not take full advantage of an important aspect of decitabine that is the re-expression of potential masked targets and pathways. The data reported here, provide not only evidence for the importance of ligand-dependence receptors pairs in the regulation of tumor development but also advocate a new strategy based on a specific targeting of gene re-expressed upon DNA hypomethylating treatment. Thus, inhibitors of DNA methylation might “prime” tumor to netrin-1 addiction and thus combining inhibitors of DNA methylation with an anti-netrin-1 antibody could turn as a powerful therapeutic strategy.

2.2.6 Acknowledgements

We are grateful to Drs A. Puisieux and AP Morel for the HMLER cells, and to Sandrine Viala for her nice and efficient work. This work was supported by institutional grants from CNRS, University of Lyon, Centre Léon Bérard and from the Ligue Contre le Cancer, INCA, ANR, ERC and Fondation Bettencourt. MG was supported by fellowship grants from LabEx DEVweCAN and ARC.

2.2.7 Materials and methods

Tumor samples:

Human breast cancer samples were provided by the tumor bank of the Centre Léon Bérard (Lyon, France). Fresh tissue samples were obtained during breast surgery before any systemic therapy and snap-frozen in liquid nitrogen. Tissue microarrays of Paraffin embedded breast tumors sections were obtained from Super Bio Chips (Cliniscience, Nanterre, France).

Cell Lines and Treatments:

Breast cancer cell lines HMLER and MDA-MB231 were maintained in Dulbecco's Minimum Essential Medium F12 Glutamax (DMEM-F12 Glutamax) (Life Technologies), supplemented with 10% FBS (Lonza, Basel, Switzerland) and 1% penicillin/ streptomycin (InVitrogen, Carlsbad, CA, USA). In addition, human EGF 10 ng/ml (Promocell, Heidelberg, Germany), hydrocortisone 0.5 µg/ml, puromycin 0.5 µg/ml (InVitrogen) and insulin 10 µg/ml (InVitrogen) were added to the medium for the HMLER cell growth. MDA-MB-231-Luc cells (Cell Biolabs, San Diego, CA, USA) were maintained in Dulbecco's Minimum Essential Medium F12 Glutamax (DMEM-F12 Glutamax) (Life Technologies), supplemented with 10% FBS (Lonza) and 1% penicillin/ streptomycin (InVitrogen). Stable shRNA cell lines derived from MDA-MB-231-Luc cells were maintained in the same medium supplemented by 2 µg/ml of puromycin (InVitrogen). Twenty-four hours after plating, cell lines were grown 3 days in fresh medium containing 10µM decitabine (Sigma-Aldrich) or 2µM 5-azacytidine (Sigma-Aldrich) renewed every day. Cells (6.10^4 per well in six-well plates) were treated with 10µM decitabine or 2µM azacytidine, and cultured in presence of net-1 mAb anti-netrin-1 antibody (10µg/mL) in presence or not of recombinant Flag-tagged netrin-1 (5µg/mL (Adipogen) in serum deprived condition for 48h.

Enforced gene expression and siRNA experiment:

We used the pcDNA3.1 vector coding for *DAPK1* [278] to enforce the expression of *DAPK1* in

HMLER cells. Empty plasmid or plasmid containing a HA-tagged DAPK construct was transfected into HMLER cells using Lipofectamine 2000 (Invitrogen). *NTN1* siRNA has been previously described[288], and was transfected using Lipofectamine 2000 in HMLER cells previously treated or not with decitabine for 72 hours. Scramble siRNA (Sigma) was used as a control.

Stable shRNA transfection in cell lines:

Control, *DAPK1*, *UNC5B* and *NTN1* shRNA plasmids (Sigma Mission shRNA) were transfected in sub-confluent cells using Lipofectamine 2000 (Invitrogen), according to the manufacturer's protocol. After transfection, 2µg/mL puromycin was added to the fresh medium as a selection factor. Transfected cells selection occurred during 5 days, cells were then trypsinized and diluted to obtain 0-2 clones per well in 96 wells plates. Puromycin selection (2 µg/mL) was kept during the shRNA transfection, selection and during all of the subsequent experiments in order to conserve the gene downregulation. After cell amplifications, cells were treated or not with decitabine and tested for their level of *DAPK1/ UNC5B/ NTN1* expression before and after DAC treatment. Clones that exhibited a "normal" proliferation rate and a low level of interest gene expression were selected.

Caspase-3 activity and viability Assays:

Caspase-3 activity was measured as previously described[278], [288] using the Ac-DEVD-AFC substrate assay (Gentaur Biovision, Brussel, Belgium). Alternatively, cell death percentage was measured by acridine orange and DAPI staining, using the NucleoCounter NC-3000 system (ChemoMetec A/S, Allerød, Denmark).

Fluorescent caspase-3 activity measurement:

The apoptotic index was measured using Cellplayer 96 well kinetic caspase 3/7 apoptosis kit, according to the manufacturer's protocol (Essen bioscience, Hertfordshire, UK). Three thousands cells were plated in 96 wells plate, treated with decitabine (DAC 10 µM final) or vehicle (PBS) for 48h, then cells were incubated in serum free medium enriched kinetic apoptosis reagent (1/5000e) with net-

1 mAb (5 µg/mL) and/or recombinant netrin-1 (5 µg/mL), DAC or PBS Cells were placed in an IncuCyte FLR or ZOOM with a 10X objective in a standard cell culture incubator at 37°C and 5% CO₂ for 48 additional hours. As a marker of proliferation, and to correct for differential proliferation of cells, the total number of DNA containing objects was counted at the final time point using Vybrant Green. This number was used to calculate the “apoptotic index”, defined as the number of caspase-3/7 positive objects divided by the total number of DNA containing objects.

TUNEL assays:

For detection of DNA fragmentation, cells were cultured on coverslips, and, after treatments, fixed 20 minutes in 4% paraformaldehyde. Then, Terminal deoxynucleodityl-transferase mediated dUTP-biotin Nick End Labeling (TUNEL) was performed using 300 U/mL TUNEL enzyme (300U/mL) and 6 µM biotinylated dUTP (Roche Diagnostics, Maylan, France).

Mouse model of xenografts:

Five-week-old female athymic Swiss^{nu/nu} mice were obtained from Charles River (Ecully, France). Mice were housed in a specific pathogen-free animal facility. $2 \cdot 10^6$ cells resuspended in 200 µL PBS of MDA-MB-231 or MDA-MB-231-Luc shRNA cell lines were implanted into the fat pad of the mammary gland. When tumors reached a volume of about 100 mm³, 10 mg/kg of netrin-1-targeting antibody net-1 mAb (Netris-Pharma, France) or an equal volume of PBS (Life Technologies), was injected intraperitoneally, twice a week for 3 weeks. Decitabine (5'-aza-2'-deoxycytidine; Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO) was injected subcutaneously into the left flank 3 times a week for 3 weeks (dosing: 0.5 mg/kg; vehicle: PBS) or replaced by PBS in the control groups. Tumor volumes were assessed twice a week with a caliper, and calculated with the formula $V = \frac{1}{2} (\text{length} \times \text{width}^2)$. In order to evaluate the efficiency of the treatments on DNA methylation, cell death induction and proliferation, tumor angiogenesis and protein expression, mice were xenografted and treated for only one week after. The PDX-HBC-146 is housed in LMT core facility. After isoflurane anesthesia, mice were engrafted with a ≈ 60 mm³ patient derived tumor graft in interscapular area. When tumors

reached 120-150 mm³, mice were injected subcutaneously with decitabine (0.5mg/kg) or PBS 3 times a week for 3 weeks and/or intraperitoneally with net-1 mAb (10 mg/kg) or with a human IgG1 control isotype antibody (Ctrl IgG1, 10 mg/kg, Evitria, Switzerland) twice a week for 3 weeks.

Immunohistochemistry analysis of xenografted cell lines and patients biopsies:

Immunohistochemistry staining was performed on an automated immunostainer (Ventana Discovery XT, Roche, Meylan, France) using DABmap Kit according to the manufacturer's instructions. Tissue samples were fixed in 10% buffered formalin and paraffin embedded. After antigen unmasking (citrate buffer pH 7.3, 98 °C for 35 min), immunostainings were performed with a rat anti-mouse netrin-1 targeting antibody (R&D), a rabbit polyclonal anti-DAPK1 (Acris) or an UNC5B antibody (Sigma), using the Novolink kit (Leica) for revelation. The apoptotic cells staining were performed using a rabbit cleaved caspase-3 specific antibody (Cell Signaling) and the *In Situ* Cell Death Detection kit POD (Roche). Angiogenesis was measured using a rabbit polyclonal CD31 (Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1) antibody (ANASPEC), and cell proliferation rate was determined using a mouse monoclonal Mib1 clone specific antibody (DAKO). Image analysis was performed using a light microscope (Eclipse E400, Nikon France, Champigny, France) equipped with a tri-CDD video camera (Sony, Japan). Quantitative values were determined by morphometric analysis (Histolab, Microvision Instruments, Evry, France) of at least 40 fields per staining at a X200 magnification for the xenograft tumor sections, and one field per staining of the total tissue section at X40 magnification for the tissue microarray. The total surface occupied by tumor tissue was measured and each surface of positive staining was expressed as a percentage of the total surface for each field. More details are available upon request.

RNA Isolation : Total RNA was extracted from biopsies using the TRIzol-Reagent (Ambion, Life Technologies), and from cell lines using the Nucleospin RNAII kit (Macherey-Nagel, Hoerd, Germany) according to the manufacturers' instructions. For RNA-seq experiments, RNA purity, integrity and quantification were assessed using agarose gel-electrophoresis and analysis on a NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA). Pools of three to five independent

extractions were sent for high-throughput sequencing to Beijing Genomics Institute (Hong-Kong, China) BGI (library preparation with the TruSeq RNA sample preparation Kit from Illumina, followed by single-end 50 bp sequencing on Illumina HiSeq 2000).

Reverse transcription and Quantitative Real-Time RT-PCR:

One μg of RNA was reverse-transcribed, using the iScript cDNA Synthesis Kit (BioRad, Ivry, France). Quantitative RT-PCR was performed using a Mini opticon (Biorad) and the SYBR supermix qPCR kit (Biorad). Polymerase was activated at 95 °C for 3 min, followed by 45 cycles of amplification and 30 s of cooling. Moreover, gene expression profiles of human samples and cell lines have been validated using 3 other ordinarily housekeeping genes to strengthen the results: *PBGD*, *GAPDH* and *MBD2*. Primer sequences for target genes are shown in Supplementary Table 2.

DNA extraction:

Biopsies samples and xenografted cell lines were cryogrounded in liquid nitrogen and DNA was extracted and purified using the Nucleospin tissue DNA extraction kit (Macherey Nagel) according to the manufacturer's protocol. DNA from cell lines was directly extracted using the standard protocol (Auriol et al., 2005)

Bisulfite treatment of genomic DNA:

Two hundred nanograms of genomic DNA were added to 1.8 μg of standard plasmid DNA (pGL3 Basic) and converted using the Epiect Bisulfite kit (Qiagen), according to the manufacturer's protocol.

Amplification of bisulfite converted DNA and pyrosequencing:

Sets of biotinylated *NTN1*, *DAPK1* and primers were designed within the promoter region (Fig 1d). As a control, non-modified and modified *GAPDH* sets of primers were used to assess the efficiency of the bisulfite DNA conversion. Modified DNA was amplified in a total volume of 50 μL using the Hotstartaq (Qiagen) kit, in presence of 1mM MgCl_2 for *DAPK1* and *NTN1* primers.

Thermal profiles were as follows: 95°C for 10 minutes followed by 50 cycles of 95°C for 30 sec, 50°C (*NTN1*) or 52°C (*DAPK1*) for 30 sec and 1 min 30 sec (*NTN1* and *DAPK1*) of extension followed by a 10 min final elongation. The primer sequences are shown in Supplementary Table 2. The quality and quantity of the PCR product was confirmed by agarose gel (2%) electrophoresis.

PCR products were then pyrosequenced using Pyromark kit (Qiagen). Reverse single-stranded biotinylated templates were isolated using the PyroMark Vacuum Prep WorkStation (Qiagen). Forty microliters of PCR product were added to 38 µL of binding buffer (Qiagen) and 2µL streptavidin sepharose high-performance beads (GE Healthcare®). The mixtures were shaken for 10 min at 1400 rpm (revolution per minute). After agitation, beads covered by biotinylated DNA were collected and retained on filter probes by permanent vacuum. The filter probes were successively immersed in different baths: in ethanol 70% for 5 s, in PyroMark denaturation solution for 5 s and in PyroMark wash buffer 1× for 15 s (Qiagen). Then the vacuum was turned off and the beads fixing DNA strands were released into a 96 well plate containing 25 µl of annealing buffer with 0.3 µM of sequencing primer in each well. The sequencing plate was kept at 80°C for 2 min and at room temperature for 5 min. Pyrosequencing reactions were performed in a PyroMark Q96 system using PyroGold reagents (Qiagen). Results were analyzed using PyroMark Software.

DNA methylation analysis

Bisulfite sequencing, used to determine the CpG methylation patterns of *DAPK1* and *NTN1* 5'UTR regions (Supplementary Table 2), was performed as described in [357]. Briefly, after a first amplification using sequence-specific primers, PCR fragments were tagged in a second amplification step and sequenced using the Roche/454 GS junior system according to the manufacturer's protocol (Roche emPCR Amplification Method Manual – Lib-A and Roche Sequencing Method Manual). The mean number of reads per sample was 475, see Supplementary Table S2. Data were analyzed using Amplifyzer (<https://pypi.python.org/pypi/amplifyzer/0.97>).

RNA-seq analysis

Reads were aligned on the UCSC *Homo sapiens* hg19 genome using TopHat2 (41). Differential expression analysis was performed as described in [358], using Galaxy server (<https://usegalaxy.org/>). Only genes with at least 1 read per million (RPM) were kept for subsequent analyses. Enriched Gene Ontology terms and KEGG pathway were identified using Gene Set Enrichment Analysis [359] with genes pre-ranked according to their fold change induced by DAC treatment.

Methyl-Capture-sequencing (Methyl-Cap-seq):

Genomic DNAs (1µg) were sheared to an average length of 300-600 bp. Methylated DNA fragments were isolated using MBD domain containing beads according to manufacturer's recommendations (MethylMiner, InVitrogen). After sequencing using the Illumina 2000 High throughput Sequencing technology by BGI service (Beijing, China), 30-40 million of 50 bp reads were obtained from each Input and Bound fraction and analyzed using R and bioconductor packages.

2.2.8 Figures and legends

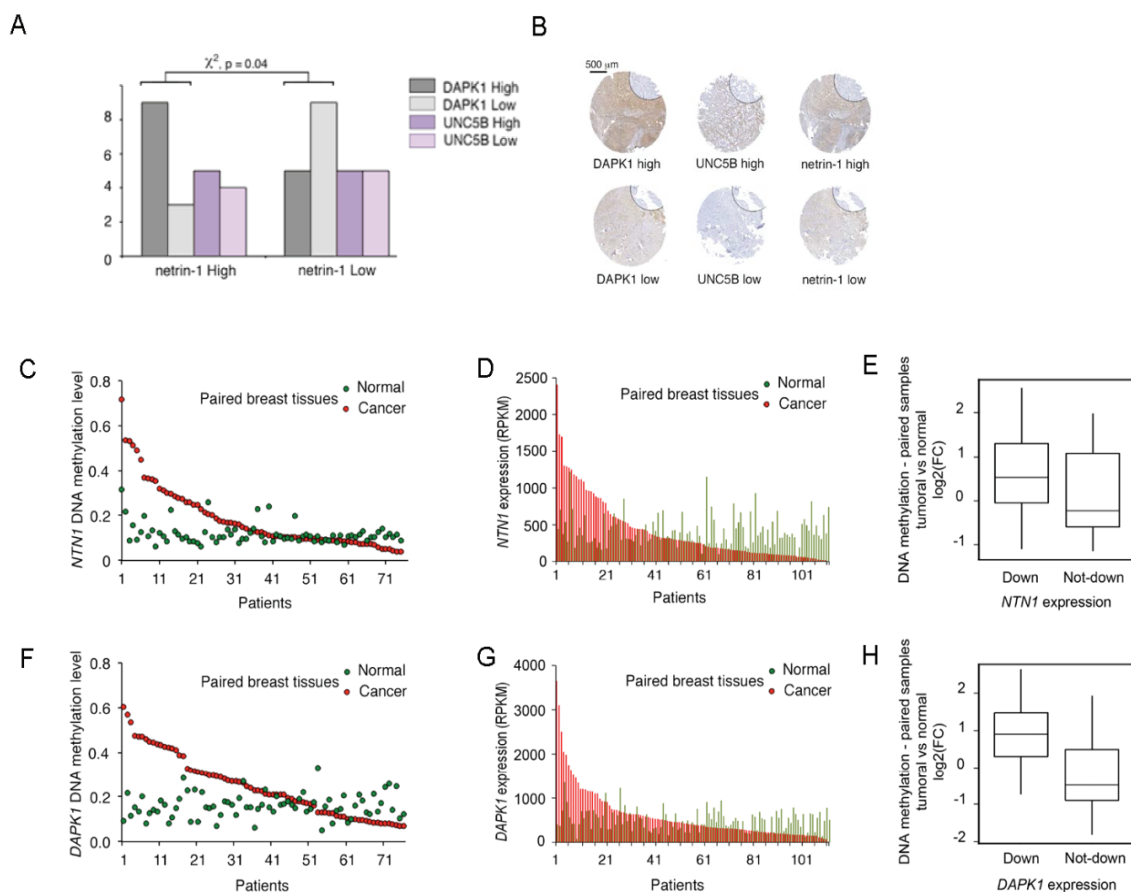


Figure 1 Grandin et al.

Figure 1.

***NTN1* and *DAPK1* are hypermethylated and downregulated in human breast cancers.**

(A) Tissue microarrays (70 sections paraffin embedded) from human breast carcinoma were immunostained with antibodies against DAPK1, UNC5B, and netrin-1. Samples were classified in quartiles according to the expression level of netrin-1. The expression levels of DAPK1 and UNC5B (index constructed from the percentage of sections exhibiting a positive staining) in the first and fourth quartiles of netrin-1 expression groups were compared using a χ^2 test.

(B) Representative staining corresponding to low and high levels of expression are shown for each antibody, expression levels were determined from the percentage of sections exhibiting a positive staining. As a control, staining of the samples using a non-related isotype antibody was performed.

(C-H) (Left panel) Rate of DNA methylation at *NTN1* (C) and *DAPK1* (F) 5'UTR regions (450K methylation array from TCGA breast cohort) in paired breast tissues (normal, green circles and tumor, red circles); (Middle panel) *NTN1* (D) and *DAPK1* (G) gene expression in paired breast tissues (normal, green bars and tumor, red bars, (RNAseq from TCGA breast cohort)); (Right panel) Tumoral/Normal DNA methylation ratio of *NTN1* (E) and *DAPK1* (H) in tumors according to gene expression (downregulated, $FC > 2$ or not downregulated, $FC < 1.3$).

See also Supplementary Figure S1.

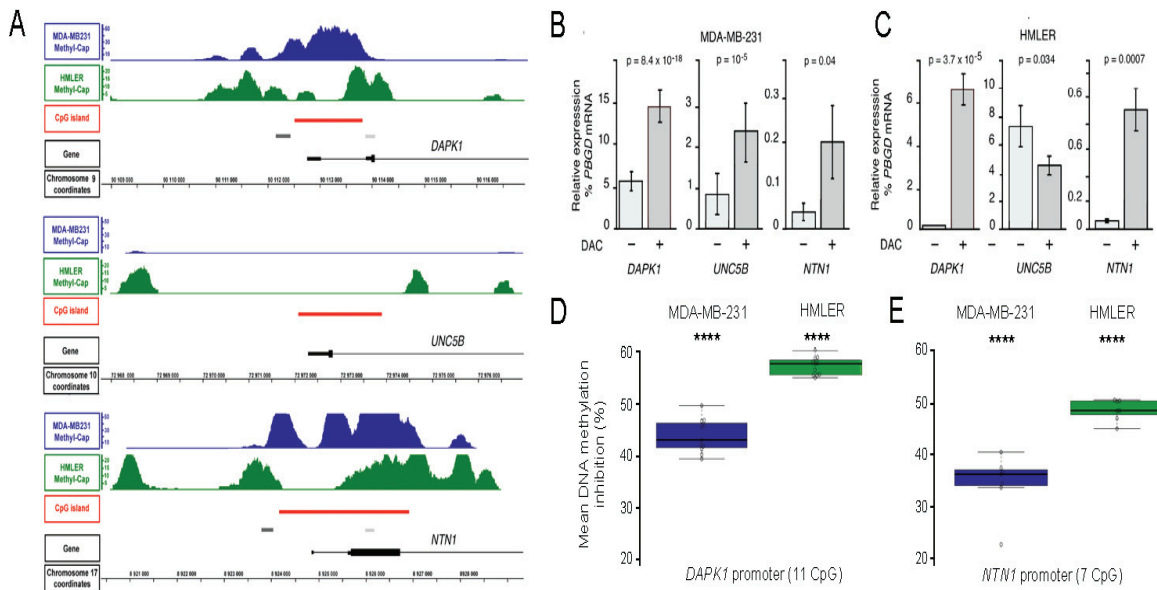


Figure 2 Grandin et al.

Figure 2.

DNA methylation and demethylation in mammary cell lines.

(A) Methyl-Cap-seq read density profiles of the 5' end of *DAPK1*, *UNC5B*, and *NTN1* in MDA-MB-231 (blue) and HMLER (green) cells. Red boxes, CGIs. Gray boxes, regions analyzed by bisulfite-PCR-sequencing. Black boxes, exons and UTR. Chromosome coordinates of each gene are given (black lines).

(B-C) Gene expression was measured by Q-RT-PCR after 72 hr from MDA-MB-231 (B) and HMLER cells (C) treated daily with 10mM decitabine (DAC). *PBGD* expression level was used as internal control. SEM corresponding to the mean values, from at least 3 independent experiments, are shown, p-values, two-tailed unpaired Student's t test.

(D-E) Measurement of DNA hypomethylation after decitabine treatment at *DAPK1* and *NTN1* promoters in MDA-MB-231 and HMLER cells; sequences were analyzed from >1960 sequencing per group in 2 independent experiments. p-values, ANOVA2 with Tukey correction, **** indicate that p-values < 0.0001.

See also Supplementary Figure S1

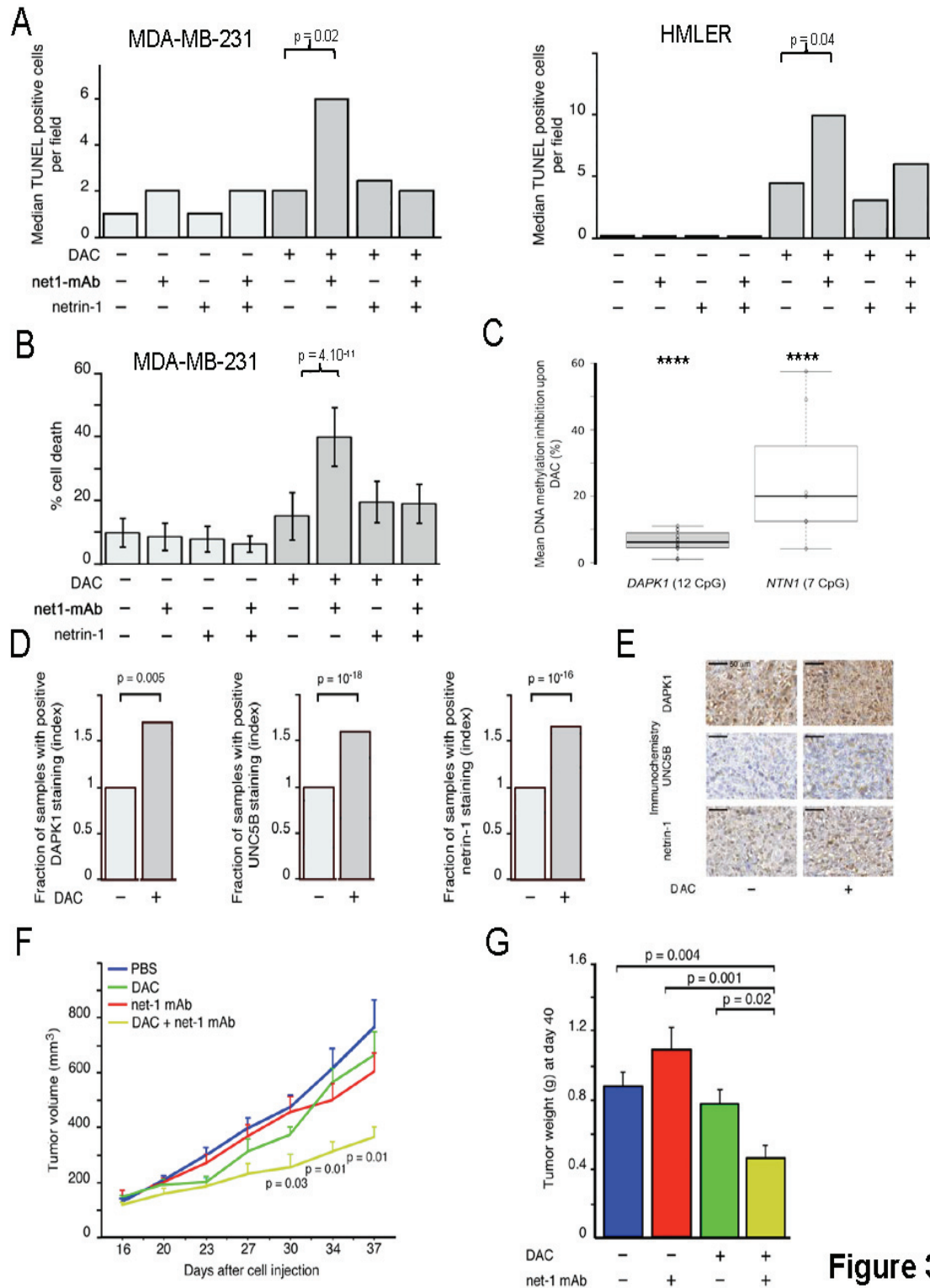


Figure 3

Figure 3. Netrin-1 blocking antibody net-1 mAb triggered apoptosis in hypomethylated breast cancer cell lines. (A-B) Cells were treated with DAC (10 μ M, 72h), and/or net-1 mAb (10 μ g/mL, 48h) and/or recombinant netrin-1 (5 μ g/mL, 48h). (A) TUNEL assays from 3 independent experiments; p-values,

Mann Whitney test. (B) Cellular mortality was tested by toxilight assay and determined in 3 independent experiments, Error bars, SEM; p-values, two-tailed unpaired Student's t test. (C) DNA loss of methylation at *NTN1* and *DAPK1* promoters in decitabine treated tumors, compared with PBS treated tumors; sequences were analyzed from >1700 sequencing per group in 2 independent experiments. p-values, ANOVA2 with Tukey correction, **** indicate that p-values < 0.0001. (D-E) After one week of mice treatments, tumor xenografts were fixed in formalin, paraffin embedded, sliced into 4 μm sections. (D) Levels of DAPK1, UNC5B, and netrin-1 were measured by immunohistochemistry staining from 4 independent tumors per treated groups, and expressed as percentage of total tumor surface; p values, Mann Whitney test. (E) Representative tumor sections corresponding to MDA-MB-231 xenografts, bars represent 50 μm . (F-G) When tumors reached 100 mm^3 , mice were injected subcutaneously with decitabine (0.4mg/kg) or PBS and/or intraperitoneally with net-1 mAb (10 mg/kg). (F) Tumor volumes were measured twice a week. Statistical significance of differences between PBS-groups and DAC + net-1 mAb-groups was determined by two-tailed unpaired Student's t test. (G) Tumor weights were measured 3 days after the end of the treatments. Statistical significance of differences between groups was determined by two-tailed unpaired Student's t test. Error bars, SEM. See also Supplementary Figures S2, S3, S4 and S5.

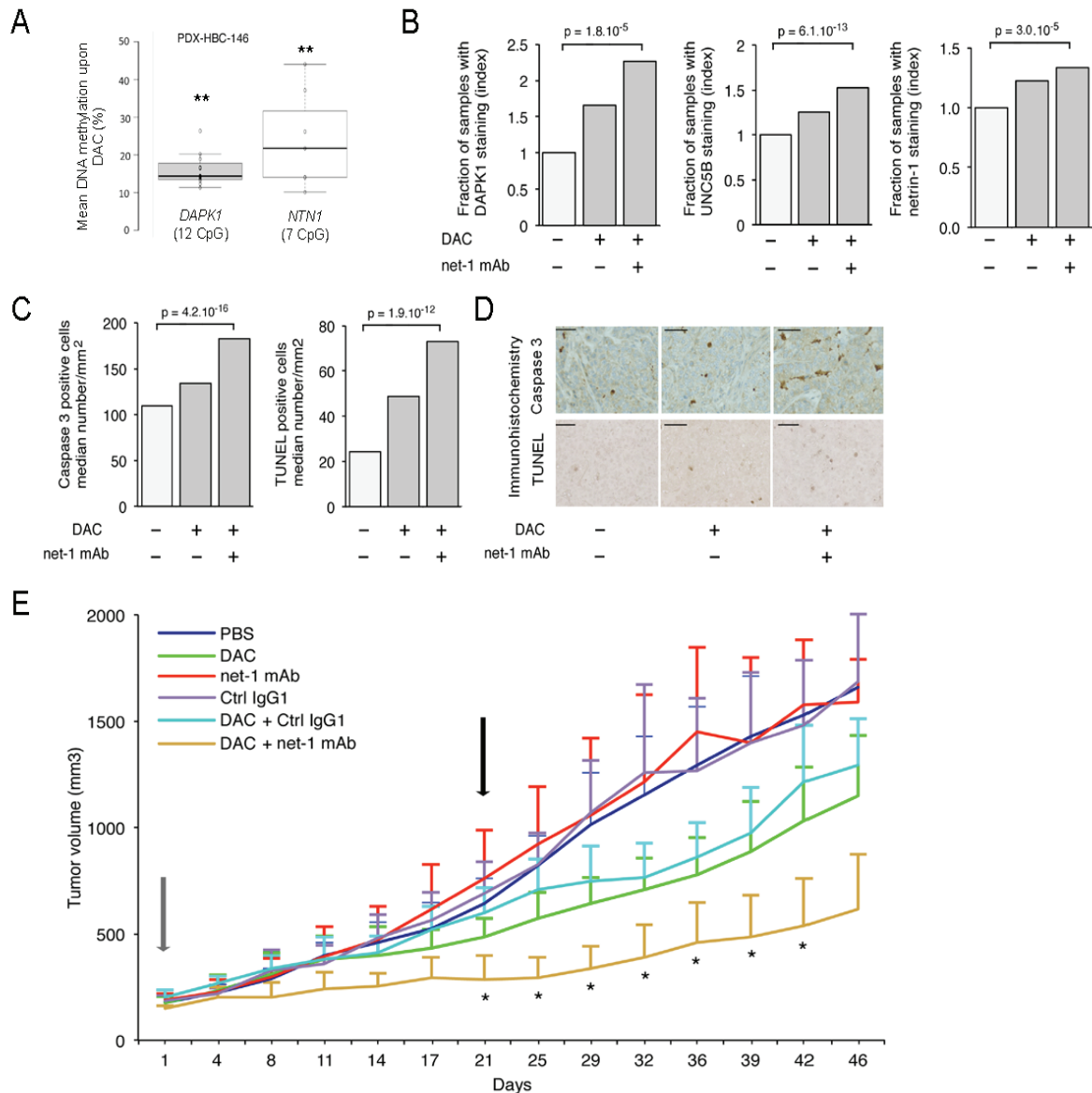


Figure 4 Grandin et al.

Figure 4. DAC treatments triggered gene up-regulation of netrin-1 receptor signaling pathway and, when combined with net-1 mAb, induced apoptosis and tumor growth inhibition in mice.

(A) DNA loss of methylation at *NTN1* (A) and *DAPK1* (B) promoters in decitabine treated PDX tumors, compared with PBS group; sequences were analyzed from >200 sequencing per group. P-values, ANOVA2 with Tukey correction, ** indicate that p-values < 0.005.

(B) Levels of DAPK1, UNC5B, and netrin-1 were measured in paraffin embedded tumor xenografts by immunohistochemistry staining from at least 3 independent tumors per treated groups, and expressed as percentage of total tumor surface; p-values, Mann Whitney test. (C) Cleaved caspase-3 and DNA fragmentation median number of cells per mm² were measured in treated xenografts; mean values from at least 3 independent tumors per treated groups; p, values, Mann-Whitney test. (D) Representative sections corresponding to (D) PDX, bars represent 50 μm. (E) net-1 mAb, combined with decitabine (DAC) reduces human breast tumor, in immuno-compromised mice. After anesthesia, mice were engrafted with a ≈60 mm³ patient-derived tumor graft in interscapular area. When tumors reached 120-150 mm³, mice were injected subcutaneously with decitabine (0.4mg/kg) or PBS and/or intraperitoneally with net-1 mAb (10 mg/kg) or with a human IgG1 control isotype antibody (Ctrl

IgG1, 10 mg/kg). The arrows indicate the treatment period (21 days). Tumor volumes were measured twice a week. n=7 mice per group. Statistical significance of differences between DAC+ Ctrl IgG1-group and DAC + net1-mAb-group was determined by two-tailed unpaired Student's t test, *p < 0.001. Error bars, SEM. See also Supplementary Figure S6.

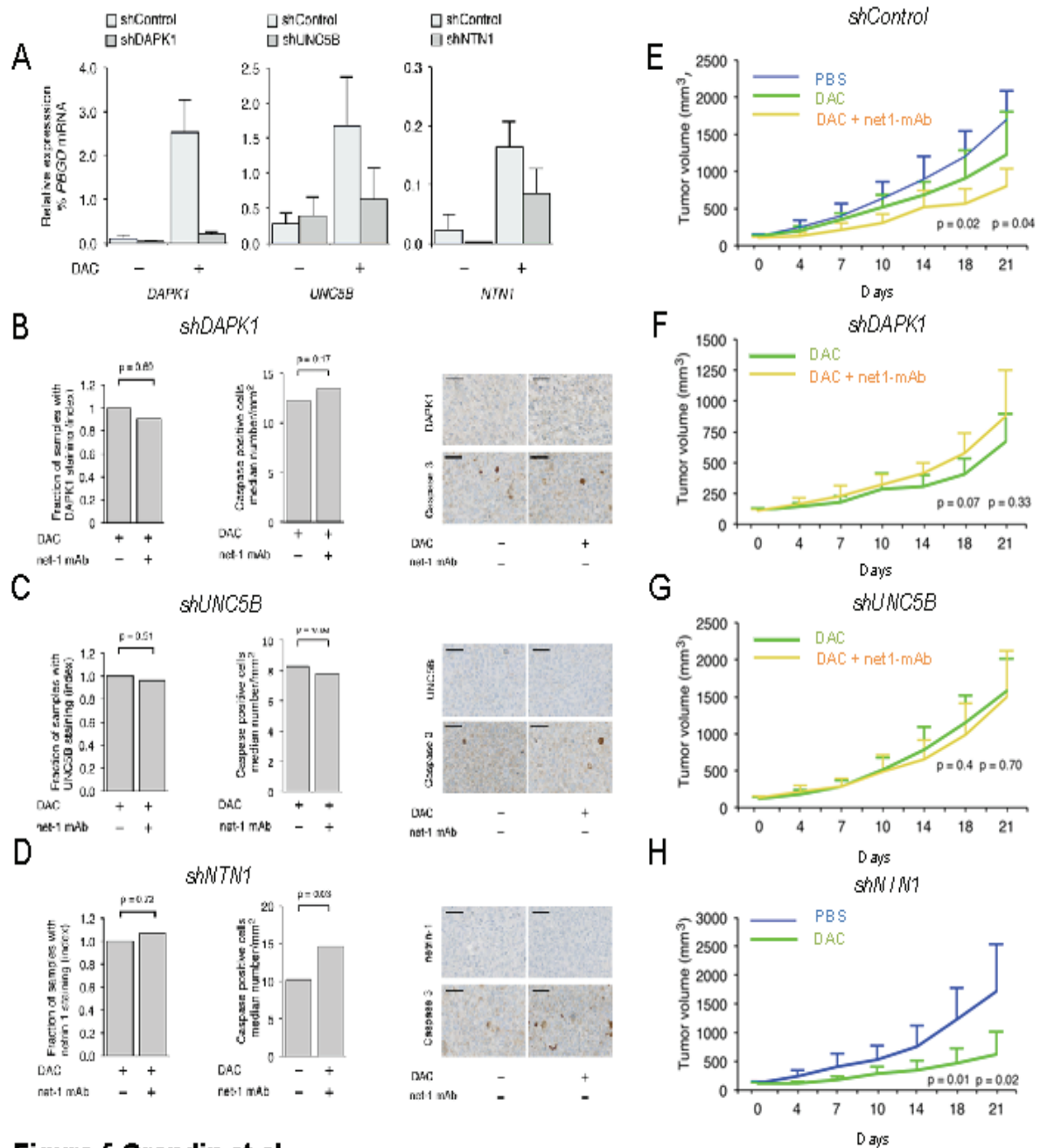


Figure 5 Grandin et al.

Figure 5. DAPK1 or UNC5B knock-down abolished xenografts sensitivity to treatment combining DAC and net-1 mAb while DAC treatment alone was sufficient to induce apoptosis in *shNTN1* xenografts. (A) Gene expression was measured by Q-RT-PCR after 72 hr in cell lines stably transfected with shRNA. Cells were treated daily with 10mM DAC. *PBGD* expression level was used as internal control. SEM corresponding to the mean values from at least 3 independent experiments are

shown, p-values, two-tailed unpaired Student's t test. (B-D) Levels of DAPK1, UNC5B, and netrin-1 were measured by immunohistochemistry in paraffin embedded tumor xenografts of MDA-MB-231 shCTRL. (Left panels) Levels of DAPK1 (B), UNC5B (C), and netrin-1 (D) were measured by immunohistochemistry in paraffin embedded tumor xenografts of MDA-MB-231 sh*DAPK1*, sh*UNC5B* and sh*NTN1*, respectively. At least 3 independent tumors per treated groups, and protein expression is expressed as percentage of total tumor surface; p-values, Mann Whitney test. (Middle panels) In parallel, apoptotic cells median number per mm² were measured; values from at least 3 independent tumors per treated groups; p, values, Mann-Whitney test. (Right panels) Representative sections of *in vivo* protein expression and apoptosis induction in MDA-MB-231 tumors cells depleted for netrin-1 dependence receptors pathway key genes. Bars represent 50 μm. (E-H) Stably transfected MDA-MB-231 cells bearing a control (E), *DAPK1* (F), *UNC5B* (G), or *NTN1* shRNA (H) were injected in the mammary fat pad of immuno-compromised mice. When tumors reached 100- 120 mm³, mice were injected subcutaneously with DAC (0.4mg/kg) or PBS and/or intraperitoneally with net-1 mAb (10 mg/kg). Tumor volumes were measured twice a week. N= 8 mice per group. Statistical significance of differences between DAC-groups and DAC + net-1 mAb-groups for sh*Control*, DAC-group and DAC + net-1 mAb-groups for sh*DAPK1* and sh*UNC5B* and PBS-groups and DAC groups for sh*NTN1*, respectively, were determined by two-tailed unpaired Student's t test. See also Supplementary Figure S7.

2.2.9 Supplemental data

Inhibition of DNA methylation promotes tumor sensitivity to netrin-1 interference.

Mélodie Grandin¹, Guillaume Devailly¹, Yannick Bidet², Pauline Mathot¹, Akram Ghantous³, Benjamin Gibert¹, Nicolas Gadot⁴, Isabelle Puisieux⁵, Zdenko Herceg³, Agnès Bernet¹, Jean-Guy Delcros¹, Patrick Mehlen^{1§}, Robert Dante^{1§}

Supplementary Figure S1 is related to Figures 1 and 2.

Supplementary Figure S2 is related to Figure 3.

Supplementary Figure S3 is related to Figure 3.

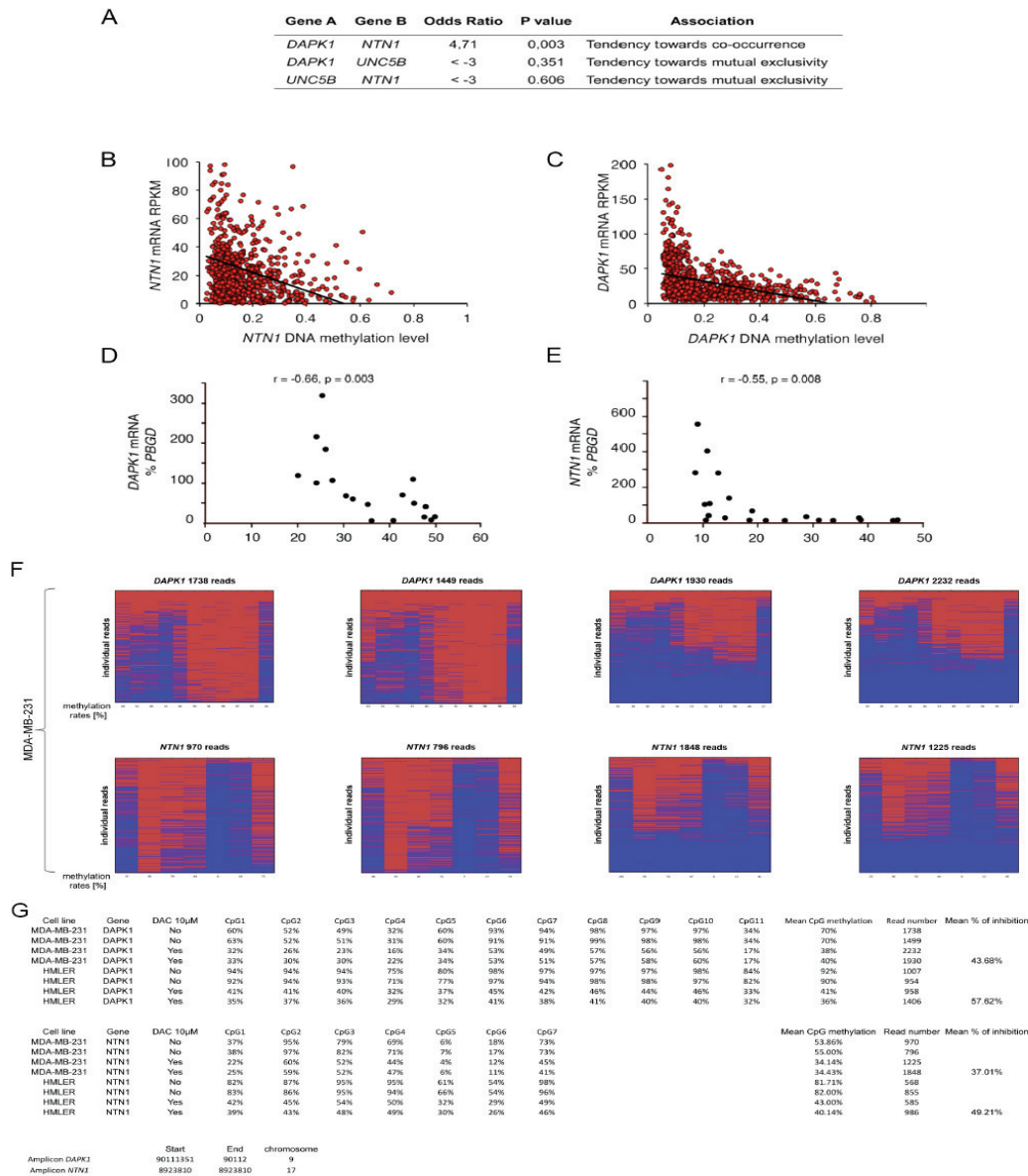
Supplementary Figure S4 is related to Figure 4.

Supplementary Figure S5 is related to Figure 4.

Supplementary Figure S6 is related to Figure 5.

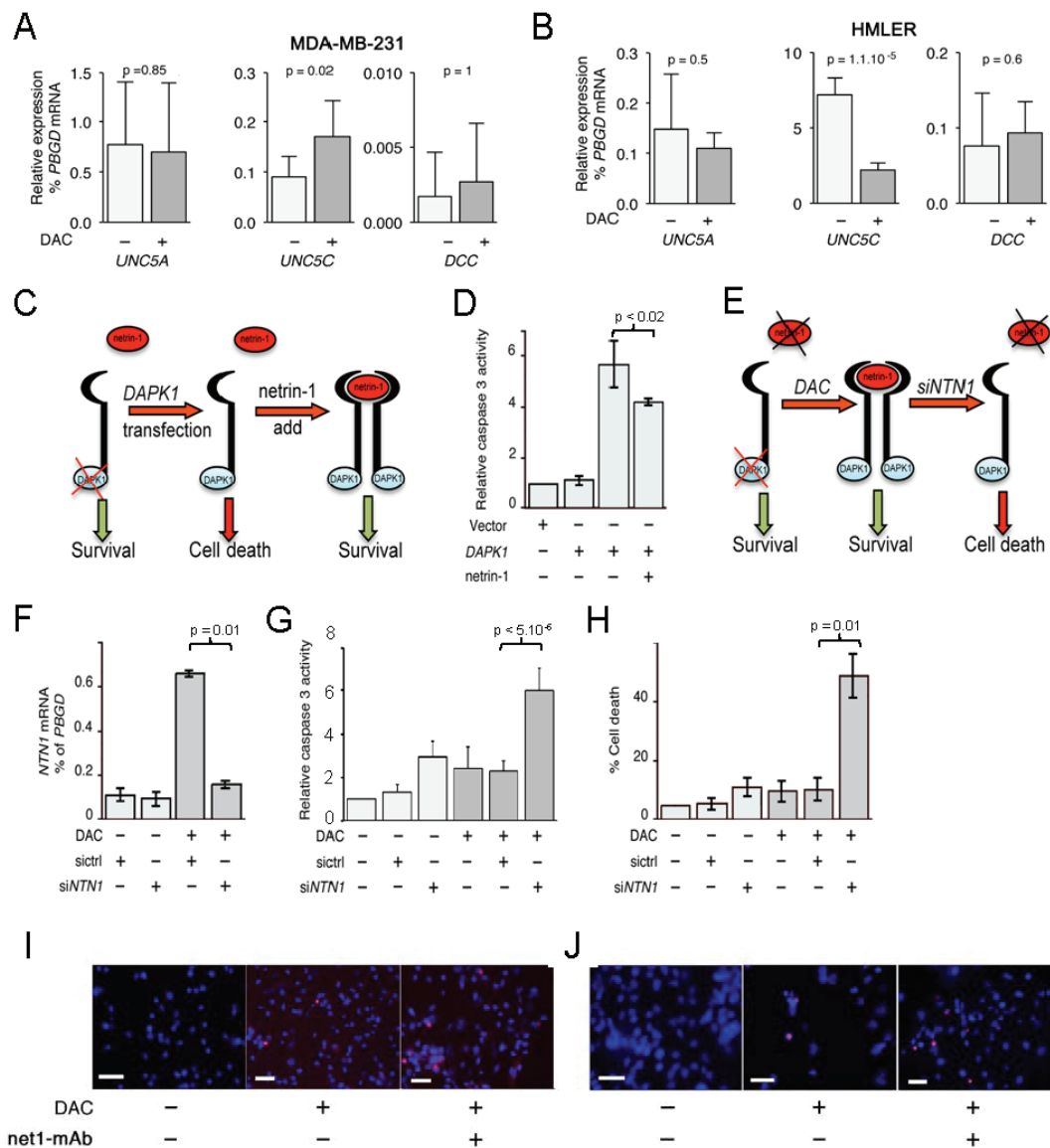
Supplementary Figure S7 is related to Figure 7.

Supplementary Table 1. Related to Experimental Procedures



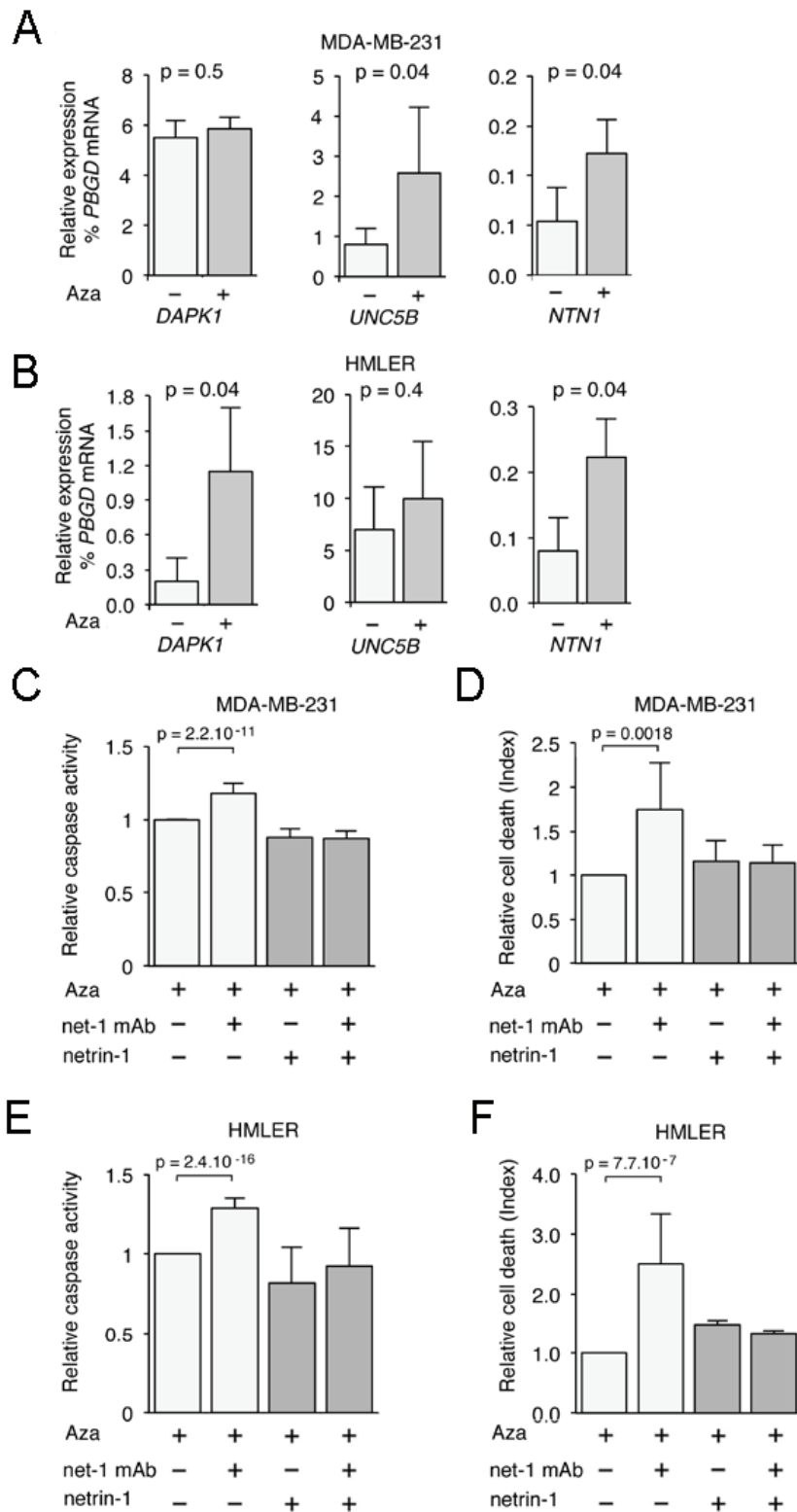
Supplementary Figure S1. Grandin et al.

Supplementary Figure S1. *NTN1* and *DAPK1* are concomitantly altered in human breast cancers. (A-B) Correlation between *DAPK1* and *NTN1* gene expression and DNA methylation in breast cancer cohort (TCGA). Pearson correlation, $p = 6.7 \cdot 10^{-5}$ $r = -0.14$ for *NTN1* (A) and $p < 10^{-16}$, $r = -0.32$ for *DAPK1* (B), respectively. (C) Quantification of the presence or absence of alterations in gene A was associated with the presence or absence of alterations in gene B in human breast tumors was determined from cBioPortal web site, z-score threshold ± 2.2 . D-E Bisulfite-PCR-sequencing (3 CpGs analyzed) indicated that DNA methylation at *DAPK1* CpG island (CGi) was inversely correlated with its expression (D), Pearson correlation, $p = 0.003$, $r = -0.66$, respectively. (E) Bisulfite PCR sequencing (4 CpGs analyzed) indicated that DNA methylation at *NTN1* CGi was inversely correlated with its expression, Pearson correlation, $p = 0.008$, $r = -0.55$ respectively. (F) Individual methylation plots. Red rectangles represent methylated CpG in each read and blue rectangles unmethylated CpG. (G) Methylation level at each CpG.



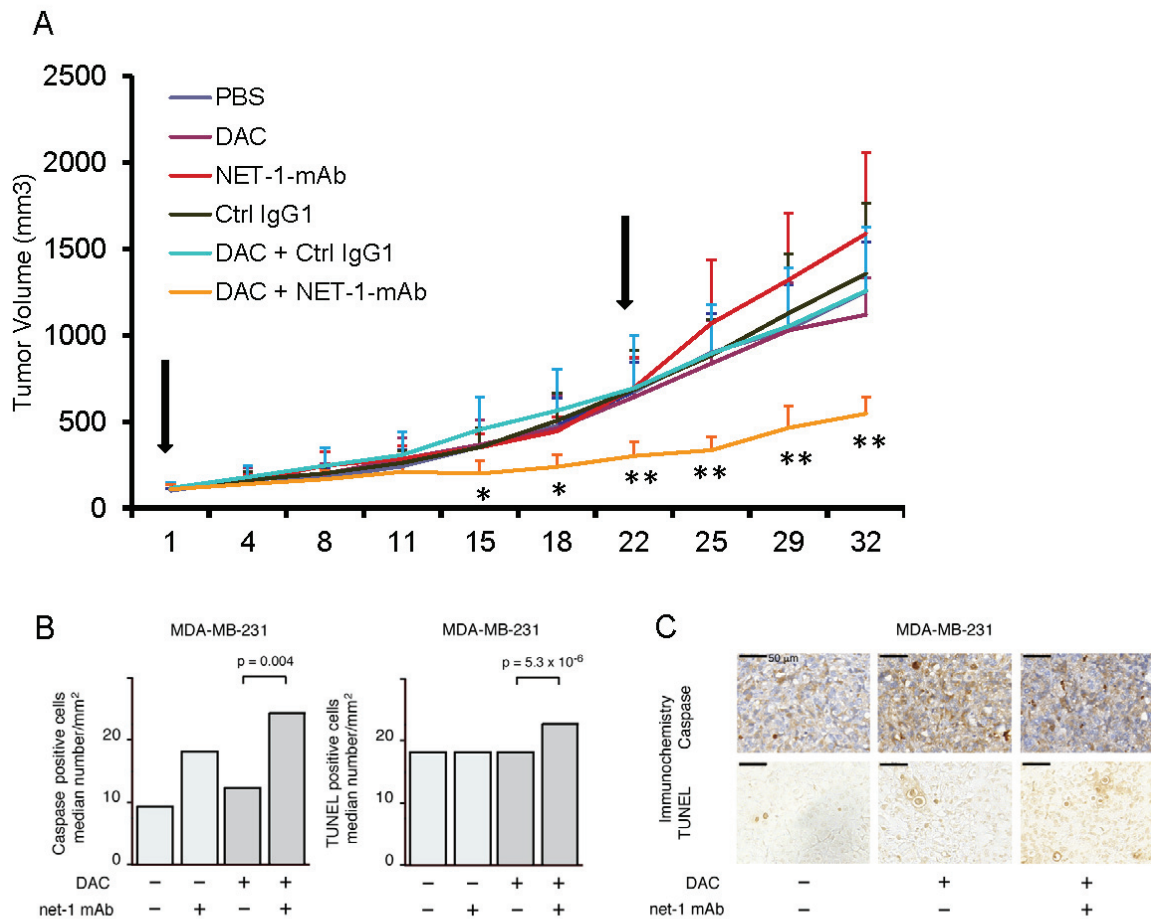
Supplementary Figure S2. NTN1 DR apoptotic pathway, mechanism and specificity. A-B Other *NTN1* DR gene expression in breast cell lines, and impact of *DAPK1* and *NTN1* in apoptotic cell death induction, *in vitro*. Gene expression was measured by Q-RT-PCR after 72 hr in MDA-MB-231 (A) and HMLER (B) cells treated daily with 10 μ M decitabine (DAC). *PBGD* expression level was used as internal control. SEM corresponding to the mean values from at least 3 independent experiments are shown, p-values, two-tailed unpaired Student's t test. C Schematic representation of the cellular effect on HMLER cells of *DAPK1* overexpression and/or recombinant netrin-1 treatment. D Caspase-3 activation upon *DAPK1* overexpression in HMLER and reversion by netrin-1 add. E Schematic representation of decitabine (DAC) and siRNA *NTN1* effect in HMLER. F siRNA *NTN1* (*siNTN1*) effect on *NTN1* expression by Q-RT-PCR. *PBGD* expression level was used as internal control. G-H *siNTN1* triggers apoptosis and cell death in hypomethylated HMLER. Cells were treated with decitabine (10 μ M, 72h), and/or *siNTN1* (30 pmol, 48h), thus caspase-3 activity (G) and cellular mortality (H) were measured. As a control, a siRNA scramble was used. SEM corresponding to the

mean values from at least 3 independent experiments are shown. I-J Representative images of TUNEL shown Fig. 3, in MDA-MB-231 and HMLER, respectively; bars represent 50 μm .



Supplementary Figure S3. The netrin-1 blocking antibody net-1 mAb triggered apoptotic cell death in breast cancer cell lines reinduced for *DAPK1*, *UNC5B* and *NTN1* upon 5-azacytidine treatment. A-B Gene expression was measured by Q-RT-PCR after 72 hr in MDA-MB-231 (A) and HMLER (B) cells treated daily with 2 μ M of 5 azacytidine (Aza). *PBGD* expression level was used as

internal control. SEM corresponding to the mean values from at least 3 independent experiments are shown, p-values, two-tailed unpaired Student's t test. C-F MDA-MB-231 and HMLER cell lines were treated with Aza, 2 μ M for 72h, and/or net-1 mAb (10 μ g/mL, 48h) and/or recombinant netrin-1 (5 μ g/mL, 48h). Caspase-3 activities (C and E) and cellular mortality (D and F) were determined in 3 independent experiments, Error bars, SEM; p-values, two-tailed unpaired Student's t test.



Supplementary Figure S4. Grandin et al.

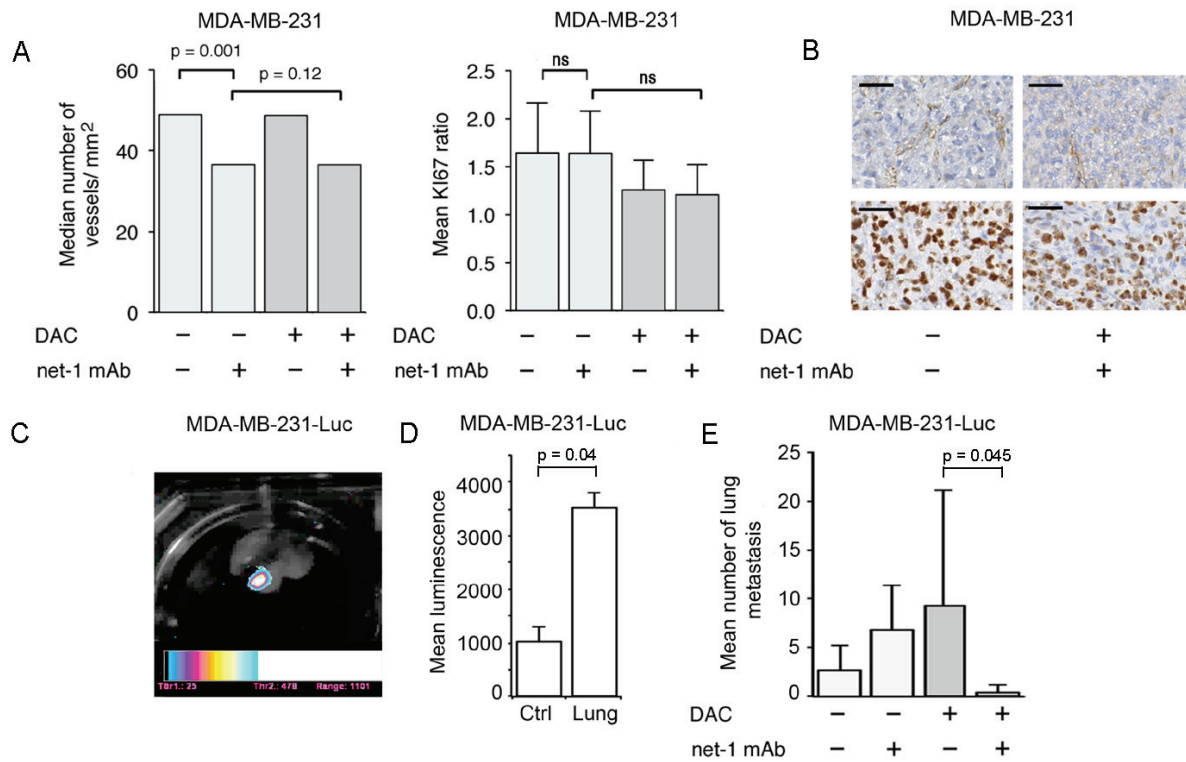
Supplementary Figure S4.

The tumor growth inhibition induced by DAC + Net-1 mAb *in vivo* is validated using another netrin-1 targeting antibody, and is associated with apoptosis increase, *in vivo*.

A When tumors reached 100 mm³, mice were injected subcutaneously with decitabine (0.5mg/kg) or PBS and/or intraperitoneally with net-1 mAb-T (10 mg/kg) or a Control IgG (Iso-mAb (10 mg/kg)). Tumor volumes were measured twice a week. Statistical significance of differences between PBS-groups and DAC + net-1 mAb-groups was determined by two-tailed unpaired Student's t test. (N= 6 mice per group).

B-C Activated caspase-3, median number of cells per mm² were measured using antibody against cleaved caspase-3 and the DNA fragmentation median number of cells per mm² were determined by TUNEL assay (B); mean values from 4 independent tumors par treated groups; p, values, Mann-

Whitney test. (C) Representative tumor sections corresponding to the histograms on the right, bars represent 50 μm .



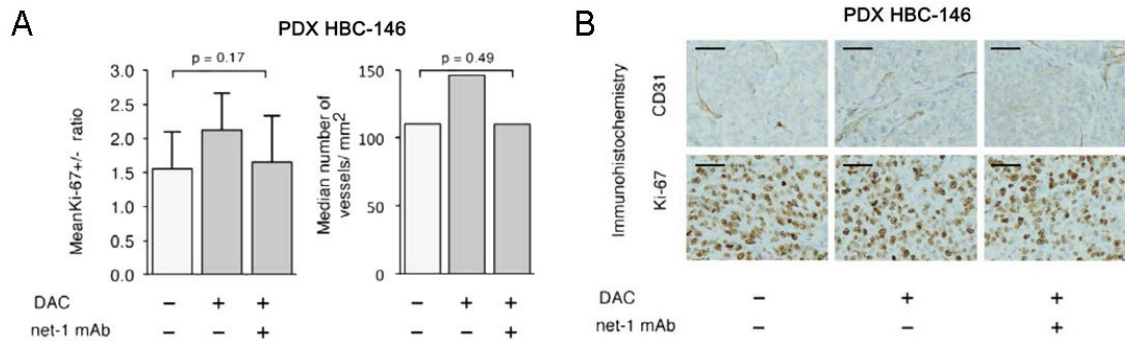
Supplementary Figure S5. Grandin et al.

Supplementary Figure S5.

Combined treatment effect leads to a reduce number of metastasis formation , and is not associated with changes in angiogenesis or proliferation.

A-B Paraffin embedded tumor xenografts were stained by immunohistochemistry using CD31 and KI67 specific antibodies. Vessel numbers in tumors were measured by CD31 immunohistochemistry staining and expressed as median number of vessels per mm^2 . P-values, Mann Whitney test. Mean proliferation rate assessed by KI67 staining; proliferative cells were divided by non-proliferative cells Error bars, SEM; p-values, Mann Whitney test. (B) Representative tumor sections corresponding to the histograms on the right, bars represent 50 μm .

C-E Combined DAC + net-1 mAb induces a decreased number of lung metastasis *in vivo*. Mouse were xenografted intravenously with $1 \cdot 10^5$ MDA-MB-231-Luc cells and treated subcutaneously with PBS, decitabine (DAC) and/ or intraperitoneally with net-1 mAb. At Day 28, mice were sacrificed and lungs were extracted for metastasis count. (C) Bioluminescence observed in lung resuspended in luciferin. (D) Luminescent activity of cells extracted from a metastasized lung, and cultured for 96h in complete medium. The control corresponds to a non-metastasized liver extracted from the same mice. (E) Number of metastasized external areas in lungs; Error bars, SEM; p-values, Student t test.



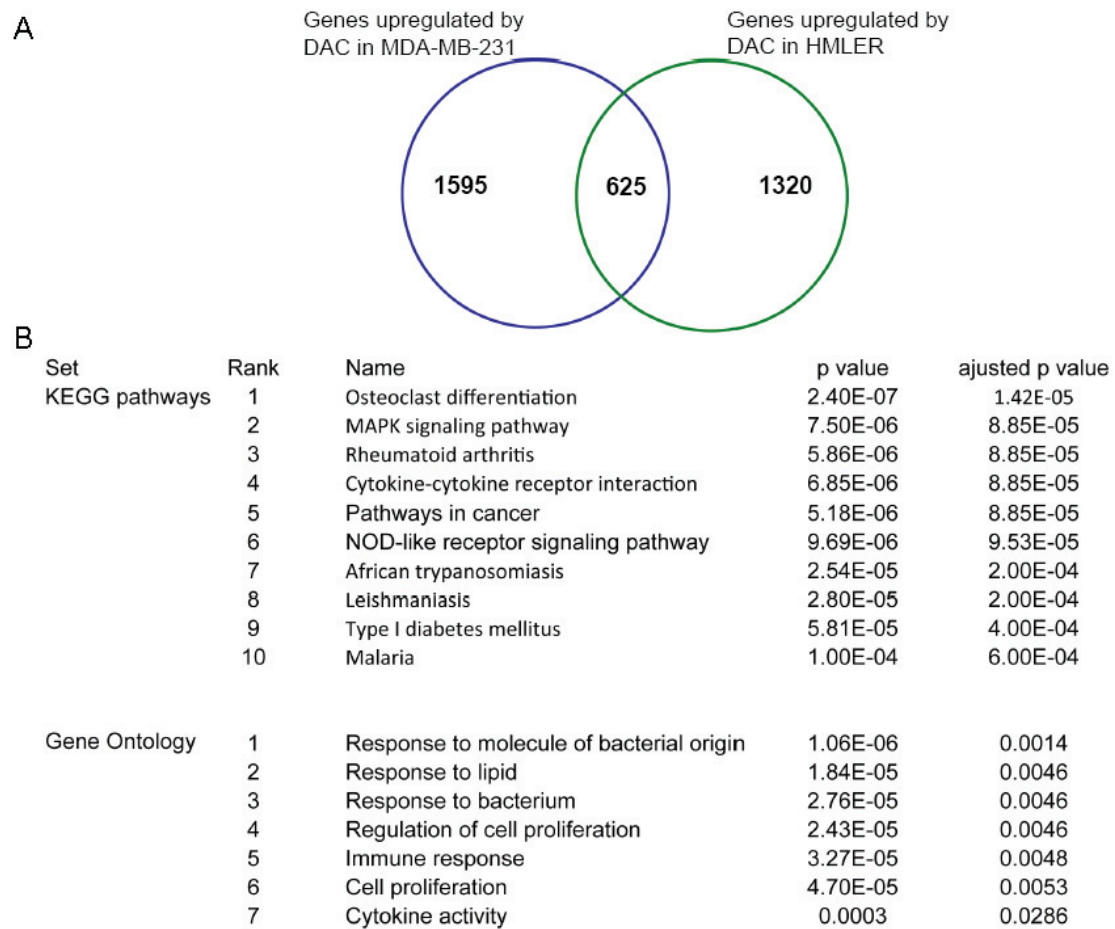
Supplementary Figure S6. Grandin et al.

Supplementary Figure S6.

Angiogenesis and cell proliferation in patient-derived xenografts treated net-1 mAb and/ or decitabine (DAC). Paraffin embedded tumor xenografts were stained using CD31 for angiogenesis and Ki-67 for cell proliferation.

A Mean proliferation rate assessed by Ki- 67 staining; proliferative cells were divided by non-proliferative cells. Angiogenesis was determined from the median number of vessels in presence of DAC and/ or net-1 mAb. Error bars, SEM; p-values, Mann Whitney test.

B Representative sections of CD31 and KI67 staining for angiogenesis and proliferation count shown in (A).



Supplementary Figure S7. Grandin et al.

Supplementary Figure S7.

Genes upregulated by decitabine treatment in MDA-MB231 and HMLER cell lines

A Venn diagram showing the overlap of genes upregulated by decitabine treatment in MDA-MB231 and HMLER cell lines.

B Gene ontology and KEGG pathways identified from of common DAC- upregulated genes between MDA-MB23 and HMLER cell lines.

Table S1. list of primers

Q-RT-PCR Primers

PBGD Forward 5'-GAGTGATTCGCGTGGGTACC-3'
Reverse 5'-GGCTCCGATGGTGAAGCC-3'

GAPDH Forward 5'-CGGAGTCAACGGATTTGGTTCGTAT-3'
Reverse 5'-AGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGAC-3'

DAPK1 Forward 5'-GATAGAAATGTCCCAAACCTCG-3'
Reverse 5'-TCTTCTTGGATCCTTGACCAGAA-3'

UNC5B Forward 5'-CCCGCCACACAGATCTACTT-3'
Reverse 5'-CAGTAATCCTCCAGCCAAA-3'

NTN1 Forward 5'-TGCAAGAAGGACTATGCCGTC-3'
Reverse 5'-GCTCGTGCCCTGCTTATACAC-3'

MBD2 Forward 5'-CCCACAACGAATGAATGAACAGC-3'
Reverse 5'-TGAAGACCTTTGGGTAGTTCCA-3'

UNC5A Forward 5'-ATCACCAAGGACACAAGTTTGC-3'
Reverse 5'-GGCTGGAAATTATCTTCTGCCGAA-3'

UNC5C Forward 5'-GCAAATTGCTGGCTAAATATCAGGAA-3'
Reverse 5'-GCTCCACTGTGTTTCAGGCTAAATCTT-3'

DCC Forward 5'-AGCCAATGGGAAAATTACTGCTTAC-3'
Reverse 5'-AGGTTGAGATCCATGATTTGATGAG-3'

NEO1 Forward 5'-TGGAAAACCAACTCCAACCTGTGA-3'
Reverse 5'-TGATTTCAACAGACCCAAAACCTTGA-3'

Pyrosequencing

Amplification primers

NTN1 Forward 5' BIO-TTATGGTTATTTATAAGTTTATGGA-3'
Reverse 5'-TAACCCAATCCTACAACAC-3'

DAPK1 Forward 5' BIO-TTTTTTGGATTGTGGAAATGTATAA-3'
Reverse 5'-AACCTTAACTACTACCTCTCCTCC-3'

GAPDH
unmodified Forward 5'-CTCTTGCTACTCTGCTCTGG-3'
Reverse 5'-GCTAAGTTTAGCCTGCCTGG-3'

GAPDH bisulfite
treated Forward 5'-GTATTTGTTGATGGGTTAAGG-3'
Reverse 5'-ATAAAAACAAATCCCCTACCC-3'

Sequencing primers

NTN1-a 5'-TAACCCAATCCTACAACAC-3'
NTN1-b 5'-CAATCCTACAACAC-3'
DAPK1-a 5' AACCTTAAATCAA 3'
DAPK1-b 5'-TTCTCTATAATTTA-3'

DNA methylation analysis

Gene specific primers for amplification of bisulfited DNA

NTN1 Forward 5'- ACACTGACGACATGGTTCTACATGAGTTGTGGTGAGTT TTTATT TT-3'
Reverse 5'- TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTAACAACATCCTTTAATCATCTTA CAA C-3'

DAPK1 Forward 5'- ACACTGACGACATGGTTCTACAGAGTTTTTTAGTGGATATGGGATT-3'
Reverse 5'- TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTTCCACCTCCAAAATTCAAATAATT-3'

2.2.10 Bibliography

- Azad N, Zahnow CA, Rudin CM, Baylin SB (2013) The future of epigenetic therapy in solid tumours - lessons from the past. *Nature reviews Clinical oncology* **10**: 256-266
- Baylin SB, Ohm JE (2006) Epigenetic gene silencing in cancer - a mechanism for early oncogenic pathway addiction? *Nature reviews Cancer* **6**: 107-116
- Bernet A, Mazelin L, Coissieux MM, Gadot N, Ackerman SL, Scoazec JY, Mehlen P (2007) Inactivation of the UNC5C Netrin-1 receptor is associated with tumor progression in colorectal malignancies. *Gastroenterology* **133**: 1840-1848
- Beygo J, Citro V, Sparago A, De Crescenzo A, Cerrato F, Heitmann M, Rademacher K, Guala A, Enklaar T, Anichini C, Cirillo Silengo M, Graf N, Prawitt D, Cubellis MV, Horsthemke B, Buiting K, Riccio A (2013) The molecular function and clinical phenotype of partial deletions of the IGF2/H19 imprinting control region depends on the spatial arrangement of the remaining CTCF-binding sites. *Human molecular genetics* **22**: 544-557
- Bongo JB, Peng DQ (2014) The neuroimmune guidance cue netrin-1: a new therapeutic target in cardiovascular disease. *Journal of cardiology* **63**: 95-98
- Castets M, Broutier L, Molin Y, Brevet M, Chazot G, Gadot N, Paquet A, Mazelin L, Jarrosson-Wuilleme L, Scoazec JY, Bernet A, Mehlen P (2012) DCC constrains tumour progression via its dependence receptor activity. *Nature* **482**: 534-537
- Cirulli V, Yebra M (2007) Netrins: beyond the brain. *Nature reviews Molecular cell biology* **8**: 296-306
- Dawson MA, Kouzarides T (2012) Cancer epigenetics: from mechanism to therapy. *Cell* **150**: 12-27
- Delloye-Bourgeois C, Brambilla E, Coissieux MM, Guenebeaud C, Pedoux R, Firlej V, Cabon F, Brambilla C, Mehlen P, Bernet A (2009) Interference with netrin-1 and tumor cell death in non-small cell lung cancer. *Journal of the National Cancer Institute* **101**: 237-247
- Devailly G, Grandin M, Perriaud L, Mathot P, Delcros JG, Bidet Y, Morel AP, Bignon JY, Puisieux A, Mehlen P, Dante R (2015) Dynamics of MBD2 deposition across methylated DNA regions during malignant transformation of human mammary epithelial cells. *Nucleic acids research* **43**: 5838-5854
- Dulaimi E, Hillinck J, Ibanez de Caceres I, Al-Saleem T, Cairns P (2004) Tumor suppressor gene promoter hypermethylation in serum of breast cancer patients. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **10**: 6189-6193
- Elenbaas B, Spirio L, Koerner F, Fleming MD, Zimonjic DB, Donaher JL, Popescu NC, Hahn WC, Weinberg RA (2001) Human breast cancer cells generated by oncogenic transformation of primary mammary epithelial cells. *Genes & development* **15**: 50-65

Fitamant J, Guenebeaud C, Coissieux MM, Guix C, Treilleux I, Scoazec JY, Bachelot T, Bernet A, Mehlen P (2008) Netrin-1 expression confers a selective advantage for tumor cell survival in metastatic breast cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**: 4850-4855

Grandin M, Meier, M, Delcros, JG, Nikodemus, D, Reuten, R, Patel, TR, Goldschneider, D, Orriss, G, Krahn, N, Boussouar, A, Abes, R, Dean, Y, Neves, D, Bernet, A, Depil, S, Schneiders, F, Poole, K, Dante, R, Koch, M, Mehlen, P, and Stetefeld, J. (2015) Structural decoding of the Netrin-1-UNC5 interaction and its therapeutical implications in cancers. *Cancer Cell, In press*

Guenebeaud C, Goldschneider D, Castets M, Guix C, Chazot G, Delloye-Bourgeois C, Eisenberg-Lerner A, Shohat G, Zhang M, Laudet V, Kimchi A, Bernet A, Mehlen P (2010) The dependence receptor UNC5H2/B triggers apoptosis via PP2A-mediated dephosphorylation of DAP kinase. *Molecular cell* **40**: 863-876

Harter PN, Zinke J, Scholz A, Tichy J, Zachskorn C, Kvasnicka HM, Goeppert B, Delloye-Bourgeois C, Hattingen E, Senft C, Steinbach JP, Plate KH, Mehlen P, Schulte D, Mittelbronn M (2014) Netrin-1 expression is an independent prognostic factor for poor patient survival in brain metastases. *PloS one* **9**: e92311

Hedrick L, Cho KR, Fearon ER, Wu TC, Kinzler KW, Vogelstein B (1994) The DCC gene product in cellular differentiation and colorectal tumorigenesis. *Genes & development* **8**: 1174-1183

Kilinc D, Ozdemir O, Ozdemir S, Korgali E, Koksall B, Uslu A, Gultekin YE (2012) Alterations in promoter methylation status of tumor suppressor HIC1, SFRP2, and DAPK1 genes in prostate carcinomas. *DNA and cell biology* **31**: 826-832

Kim D, Pertea G, Trapnell C, Pimentel H, Kelley R, Salzberg SL (2013) TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome biology* **14**: R36

Kissil JL, Feinstein E, Cohen O, Jones PA, Tsai YC, Knowles MA, Eydmann ME, Kimchi A (1997) DAP-kinase loss of expression in various carcinoma and B-cell lymphoma cell lines: possible implications for role as tumor suppressor gene. *Oncogene* **15**: 403-407

Krimpenfort P, Song JY, Proost N, Zevenhoven J, Jonkers J, Berns A (2012) Deleted in colorectal carcinoma suppresses metastasis in p53-deficient mammary tumours. *Nature* **482**: 538-541

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

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

Lund P, Kotova I, Kedinger V, Khanwalkar H, Voltz E, Hahn WC, Gronemeyer H (2011) Transformation-dependent silencing of tumor-selective apoptosis-inducing TRAIL by DNA hypermethylation is antagonized by decitabine. *Molecular cancer therapeutics* **10**: 1611-1623

Mehlen P, Guenebeaud C (2010) Netrin-1 and its dependence receptors as original targets for cancer therapy. *Current opinion in oncology* **22**: 46-54

Mian OY, Wang SZ, Zhu SZ, Gnanapragasam MN, Graham L, Bear HD, Ginder GD (2011) Methyl-binding domain protein 2-dependent proliferation and survival of breast cancer cells. *Molecular cancer research : MCR* **9**: 1152-1162

Morel AP, Lievre M, Thomas C, Hinkal G, Ansieau S, Puisieux A (2008) Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition. *PloS one* **3**: e2888

Paradisi A, Creveaux M, Gibert B, Devailly G, Redoulez E, Neves D, Cleysac E, Treilleux I, Klein C, Niederfellner G, Cassier PA, Bernet A, Mehlen P (2013) Combining chemotherapeutic agents and netrin-1 interference potentiates cancer cell death. *EMBO molecular medicine* **5**: 1821-1834

Pulling LC, Grimes MJ, Damiani LA, Juri DE, Do K, Tellez CS, Belinsky SA (2009) Dual promoter regulation of death-associated protein kinase gene leads to differentially silenced transcripts by methylation in cancer. *Carcinogenesis* **30**: 2023-2030

Ramkhalawon B, Hennessy EJ, Menager M, Ray TD, Sheedy FJ, Hutchison S, Wanschel A, Oldebeken S, Geoffrion M, Spiro W, Miller G, McPherson R, Rayner KJ, Moore KJ (2014) Netrin-1 promotes adipose tissue macrophage retention and insulin resistance in obesity. *Nature medicine* **20**: 377-384

Raval A, Tanner SM, Byrd JC, Angerman EB, Perko JD, Chen SS, Hackanson B, Grever MR, Lucas DM, Matkovic JJ, Lin TS, Kipps TJ, Murray F, Weisenburger D, Sanger W, Lynch J, Watson P, Jansen M, Yoshinaga Y, Rosenquist R, de Jong PJ, Coggill P, Beck S, Lynch H, de la Chapelle A, Plass C (2007) Downregulation of death-associated protein kinase 1 (DAPK1) in chronic lymphocytic leukemia. *Cell* **129**: 879-890

Rodriguez-Paredes M, Esteller M (2011a) Cancer epigenetics reaches mainstream oncology. *Nature medicine* **17**: 330-339

Rodriguez-Paredes M, Esteller M (2011b) A combined epigenetic therapy equals the efficacy of conventional chemotherapy in refractory advanced non-small cell lung cancer. *Cancer discovery* **1**: 557-559

Shin SK, Nagasaka T, Jung BH, Matsubara N, Kim WH, Carethers JM, Boland CR, Goel A (2007) Epigenetic and genetic alterations in Netrin-1 receptors UNC5C and DCC in human colon cancer. *Gastroenterology* **133**: 1849-1857

Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, Paulovich A, Pomeroy SL, Golub TR, Lander ES, Mesirov JP (2005) Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 15545-15550

Tang X, Wu W, Sun SY, Wistuba II, Hong WK, Mao L (2004) Hypermethylation of the death-associated protein kinase promoter attenuates the sensitivity to TRAIL-induced apoptosis in human non-small cell lung cancer cells. *Molecular cancer research : MCR* **2**: 685-691

Tsai HC, Li H, Van Neste L, Cai Y, Robert C, Rassool FV, Shin JJ, Harbom KM, Beaty R, Pappou E, Harris J, Yen RW, Ahuja N, Brock MV, Stearns V, Feller-Kopman D, Yarmus LB, Lin YC, Welm

AL, Issa JP, Minn I, Matsui W, Jang YY, Sharkis SJ, Baylin SB, Zahnow CA (2012) Transient low doses of DNA-demethylating agents exert durable antitumor effects on hematological and epithelial tumor cells. *Cancer cell* **21**: 430-446

Wang J, Duncan D, Shi Z, Zhang B (2013) WEB-based GENE SeT AnaLysis Toolkit (WebGestalt): update 2013. *Nucleic acids research* **41**: W77-83

Yang D, Torres CM, Bardhan K, Zimmerman M, McGaha TL, Liu K (2012) Decitabine and vorinostat cooperate to sensitize colon carcinoma cells to Fas ligand-induced apoptosis in vitro and tumor suppression in vivo. *J Immunol* **188**: 4441-4449

Yang X, Lay F, Han H, Jones PA (2010) Targeting DNA methylation for epigenetic therapy. *Trends in pharmacological sciences* **31**: 536-546

Zhu Y, Li Y, Haraguchi S, Yu M, Ohira M, Ozaki T, Nakagawa A, Ushijima T, Isogai E, Koseki H, Nakamura Y, Kong C, Mehlen P, Arakawa H, Nakagawara A (2013) Dependence receptor UNC5D mediates nerve growth factor depletion-induced neuroblastoma regression. *The Journal of clinical investigation* **123**: 2935-2947

2.3 Travaux complémentaires non publiés

2.3.1 Des données supplémentaires pour les cohortes TCGA

2.3.1.1 Cancer pulmonaire

2.3.1.1.1 Altérations de DAPK1 et stades tumoral associé

Nous l'avons vu précédemment, DAPK1 est très fréquemment perdu dans les NSCLC. Nous nous sommes demandé si ce phénomène était lié à un stade tumoral. J'ai donc repris l'analyse de la cohorte TCGA d'adénocarcinomes, ai extrait les données de patients et vérifié le taux d'expression de DAPK1 en fonction des stades de la maladie (**Figure 34**).

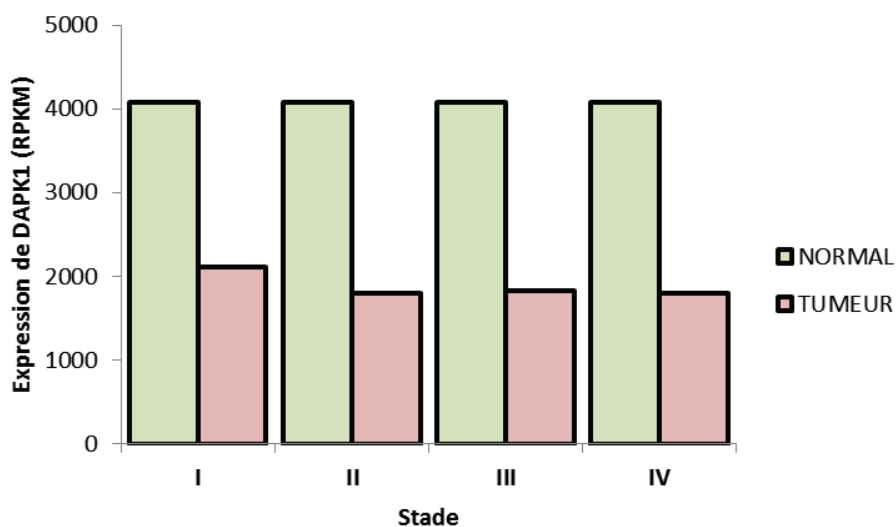


Figure 34 : Perte d'expression de DAPK1 dans les adénocarcinomes pulmonaires et stades tumoraux associés. Les moyennes sont calculées d'après N= 249, 112, 79 et 24 échantillons pour les stades I, II, III et IV, respectivement et N= 58 échantillons normaux. RPKM : Reads Per Kilobase per Million mapped reads.

Pour l'expression dans les tissus normaux, j'ai considéré la moyenne de l'ensemble des échantillons, contrairement aux tissus tumoraux que j'ai classé selon les stades associés puis j'en ai fait la moyenne.

Les résultats montrent une forte répression transcriptionnelle de DAPK1 dans tous les stades, et peu de variations d'un stade à l'autre. Ce gène semble donc altéré dès les premiers stades de tumorigénèse, puis le reste durant la progression tumorale.

2.3.1.1.2 Relation méthylation expression sur l'ensemble de la cohorte.

Dans le manuscrit soumis à Cancer Cell (papier N°1), nous avons montré le lien entre expression et méthylation pour *DAPK1* et *NTN1* (Figure 6 E et F). Cette relation ne prend pas en compte l'expression génique dans les tissus normaux (avec leurs variations interindividuelles potentielles). Nous nous sommes donc concentré sur la mise en évidence d'une corrélation entre méthylation et expression dans les NSCLC, en prenant en compte le ratio d'expression et de méthylation des tissus normaux. Nous avons donc raisonné en termes de ratio tumeur/ normal (T/N) (Figure 35).

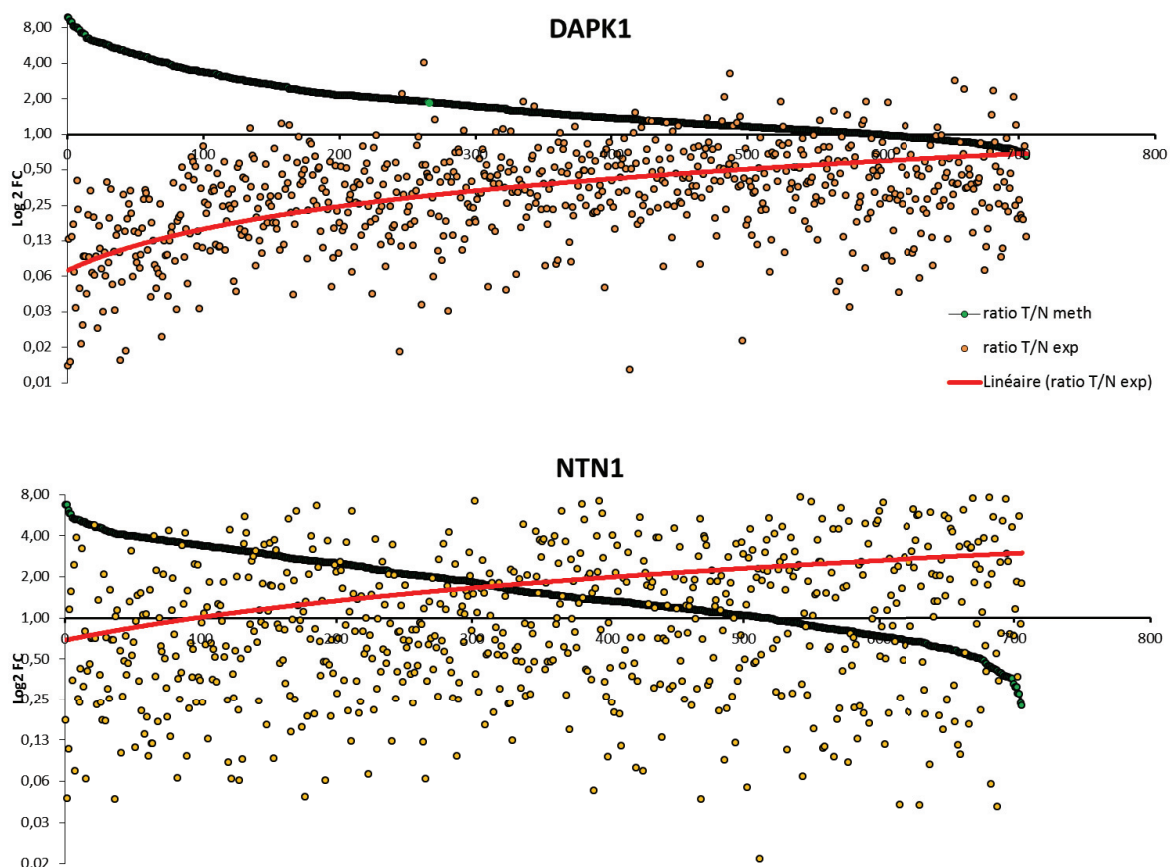
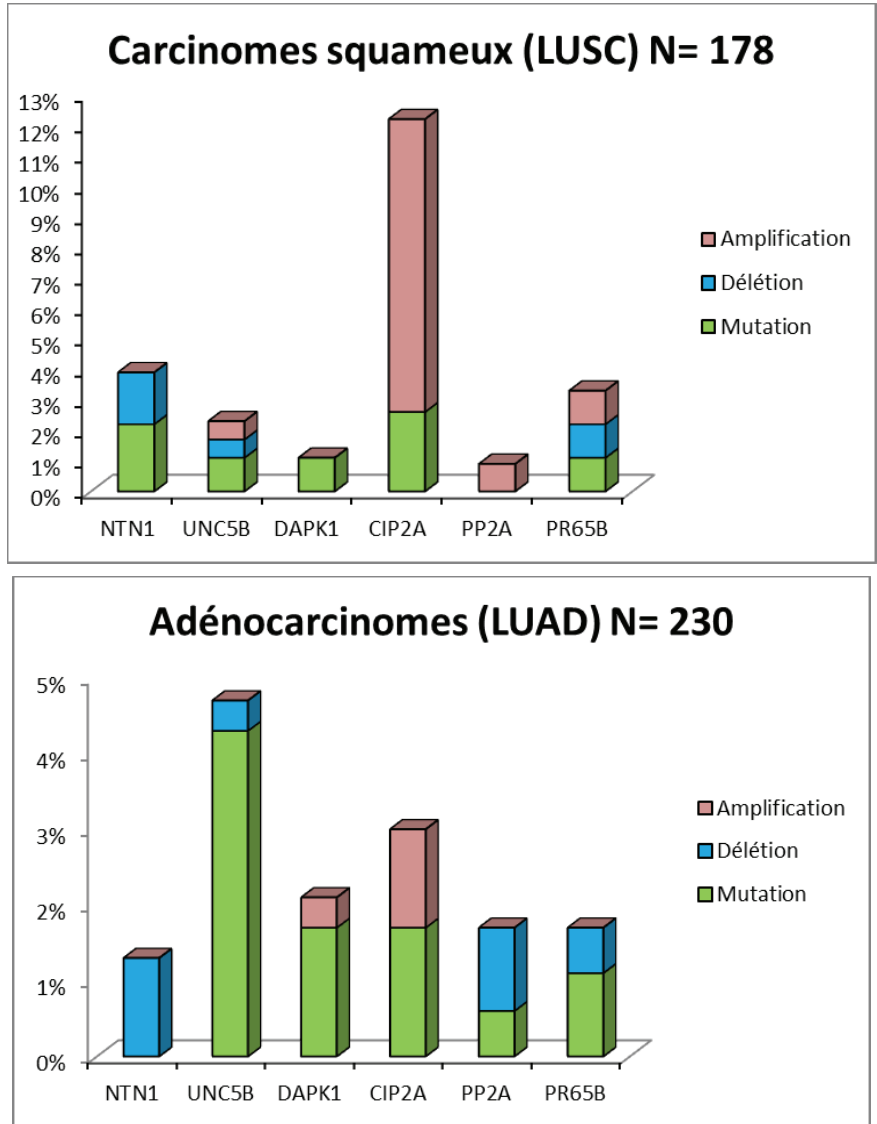


Figure 35 : Corrélation méthylation et expression dans les NSCLC, exprimé sous forme de ratio tumeur/ normal pour l'expression et la méthylation de DAPK1 (haut) et NTN1 (bas). Les échantillons sont classés selon le ratio T/N en termes de méthylation (Vert), et les tendances d'expression des échantillons correspondant (Orange) sont résumés par la courbe de tendance (Rouge). Les valeurs sont exprimées en Log2 Ratio. (N= 706 échantillons tumoraux comparés à N= 70 échantillons sains).



| | Nb total d'échantillons | Altération | p53 |
|-----------------|-------------------------|---------------|-----|
| Lung SCC (LUSC) | 178 | Mutation | 77% |
| | | Délétion | 0% |
| | | Amplification | 0% |
| Lung AD (LUAD) | 230 | Mutation | 44% |
| | | Délétion | 0% |
| | | Amplification | 0% |

Figure 36 : Mutations, délétions et amplifications des principaux gènes de la voie pro-apoptotique d'UNC5B dans les NSCLC. Pourcentages d'amplifications, mutations et délétions des gènes NTN1, UNC5B, DAPK1, CIP2A, PP2A et PR65B dans les carcinomes squameux (Haut) et les adénocarcinomes pulmonaires (Milieu). (Bas) : taux de mutations, amplifications et délétions de p53 dans les LUSC et LUAD.

On observe ici des résultats similaires aux tendances précédemment décrites, suggérant une faible variabilité des taux d'expression et de méthylation des tissus normaux.

2.3.1.1.3 Autres altérations de la voie pro-apoptotique d'UNC5B dans les NSCLC.

Nous nous sommes ensuite demandé si d'autres altérations pouvaient toucher cette voie dans les NSCLC. Ainsi, j'ai analysé séparément les carcinomes squameux et les adénocarcinomes de la cohorte TCGA pour leurs altérations (**Figure 36**).

Globalement, les altérations génétiques des différents protagonistes de cette voie sont assez rares, à l'exception de CIP2A, le facteur anti-apoptotique empêchant le recrutement du complexe PP2A, responsable de l'activation de DAPK1 en absence de ligand nétrine-1. De plus, p53 est fréquemment muté dans ces cancers.

2.3.1.2 Cancer mammaire

2.3.1.2.1 Expression des RD et survie

Nous avons montré durant nos travaux que l'expression de *NTN1* et *DAPK1* sont étroitement liées (manuscrit soumis à EMBO MM, Figure S1A). De plus, il a été montré que les cancers agressifs mammaires surexpriment *NTN1*, et cette surexpression est corrélée à l'agressivité des tumeurs [290].

La question que l'on peut se poser est donc la suivante : quelle est l'implication de *DAPK1* dans l'agressivité des tumeurs liée à la surexpression de *NTN1* ? Nous avons donc adressé cette question de la manière suivante : nous avons considéré l'ensemble des données de la cohorte mammaire TCGA. Nous avons alors divisé la cohorte par quartile en fonction de l'expression de *DAPK1* d'une part, et de *NTN1* d'autre part. Nous avons ensuite cherché quels échantillons étaient en commun entre les différents groupes formés (**Figure 37**).

Afin de tester la qualité des résultats, nous avons testé sur cette même cohorte l'influence du stade tumoral sur la survie globale des patientes. On peut observer que plus le stade du cancer est élevé, plus la survie est diminuée, ce qui est attendu. Parmi les différentes combinaisons, une se détache en tant que facteur de mauvais pronostic ; il s'agit du groupe de tumeurs présentant une régulation positive de *NTN1* (ce qui est également attendu), mais également de *DAPK1*.

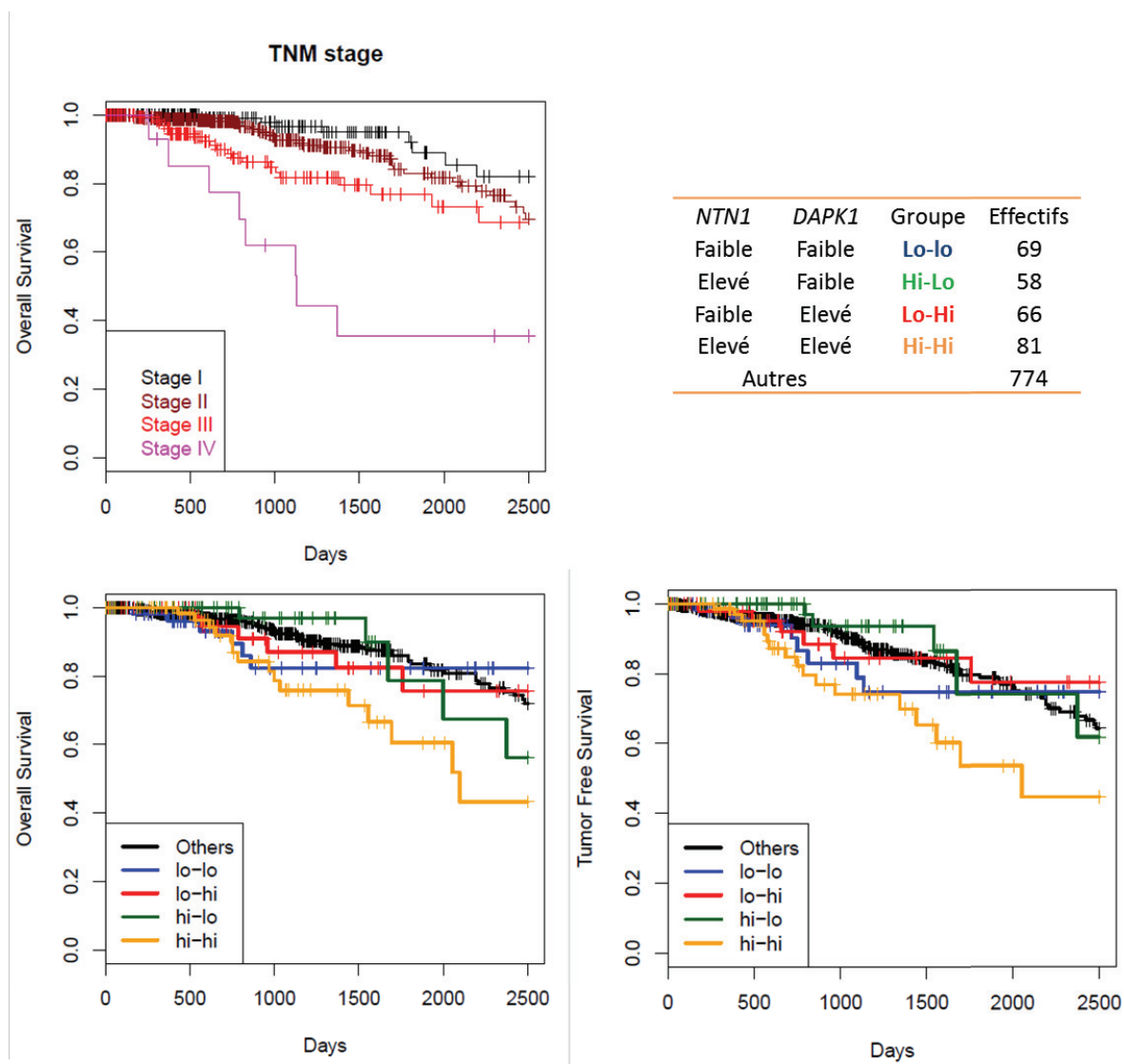


Figure 37 : Courbes de survie en fonction de l'expression de *DAPK1* et *NTN1* dans les carcinomes mammaires. (haut gauche) Courbe de survie en fonction du stade tumoral (classification TNM). (Haut droite) Tableau répertoriant les groupes testés : quartile d'expression de *NTN1* et *DAPK1* faibles et élevés. (Bas) Courbes de survie (gauche) et de rechute (droite) en fonction des quartiles d'expression de *NTN1* et *DAPK1*.

Enfin, j'ai trié la cohorte selon les statuts ER, PR et HER2neu. J'ai ainsi déterminé l'expression médiane de *DAPK1*, *UNC5B* et *NTN1* pour 105 tumeurs, que j'ai comparées à la médiane des échantillons normaux. Ainsi, j'ai pu observer que dans les tumeurs triple-négatives, cette voie semble globalement augmentée transcriptionnellement (**Figure 38**).

Bien que ce résultat soit préliminaire, et que tout reste à valider, l'hypothèse que l'on peut formuler est que ce type de tumeurs pourrait être un bon candidat pour les premiers essais

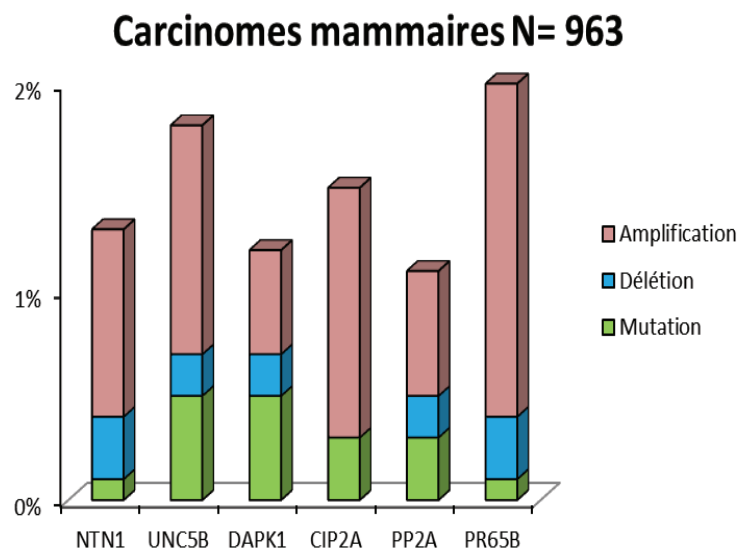
cliniques de l'anticorps NET1-mAb en monothérapie. Il est à noter que dans ce contexte, les travaux menés sur la lignée triple négative MDA-MB-231 n'ont pas montré ce type de profil, faisant de cette lignée un modèle d'étude inadéquat.

| Médianes | <i>DAPK1</i> | <i>UNC5B</i> | <i>NTN1</i> |
|-----------------------------------|--------------|--------------|-------------|
| Normal (N= 106) | 25,36 | 23,14 | 19,32 |
| Tumeurs triple négatives (N= 105) | 48,44 | 46,12 | 25,58 |

Figure 38 : Expression des gènes de la voie pro-apoptotique d'UNC5B dans les tumeurs mammaires triple négatives. Les valeurs sont exprimées en RPKM.

2.3.1.2.2 Mutations et pertes d'hétérozygotie

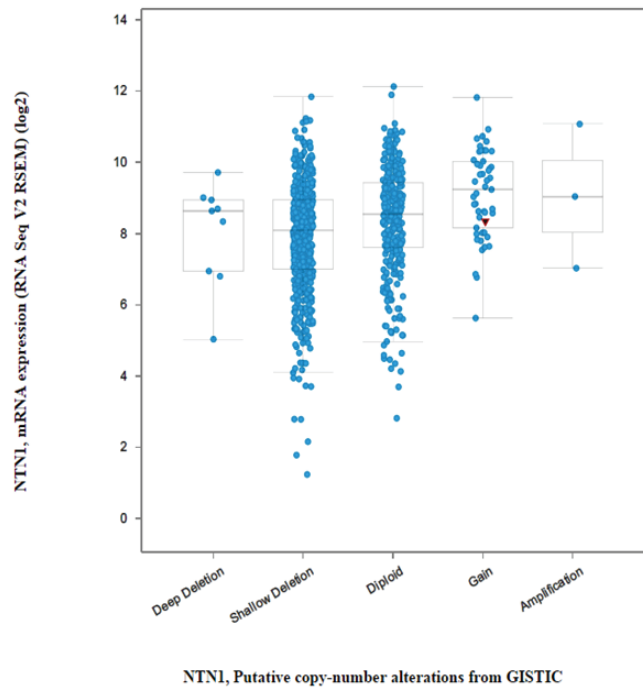
Nous nous sommes ensuite demandé si d'autres altérations pouvaient toucher cette voie dans les tumeurs mammaires. Ainsi, j'ai analysé la cohorte TCGA pour leurs altérations. A l'exception de p53, les altérations génétiques des différents protagonistes de cette voie sont assez rares (**Figure 39**).



| Nb total d'échantillons | Altération | <i>NTN1</i> | <i>UNC5B</i> | <i>DAPK1</i> | <i>CIP2A</i> | <i>PP2A</i> | <i>PR65B</i> | <i>p53</i> |
|-------------------------|---------------|-------------|--------------|--------------|--------------|-------------|--------------|------------|
| 963 | Mutation | 0% | 1% | 1% | 0% | 0% | 0% | 30% |
| | Délétion | 0% | 0% | 0% | 0% | 0% | 0% | 1% |
| | Amplification | 1% | 1% | 1% | 1% | 1% | 2% | 0% |

Figure 39 : Altérations génétiques des gènes de la voie pro-apoptotique d'UNC5B dans les tumeurs mammaires. Données obtenues et compilées à partir de cbiportal.

Néanmoins, une seconde étude du nombre de copies à l'aide du site cbiportal (www.cbiportal.org) nous a révélé un important taux de pertes d'hétérozygotie de *NTN1* dans les tumeurs (plus de 60% des cas), ce dernier est également corrélé à une diminution de l'expression du gène (**Figure 40**).



| Alteration | Nb de cas | % | Expression médiane par groupe (RPKM) |
|-----------------------|-----------|------|--------------------------------------|
| Délétion | 9 | 0,9 | 397,678 |
| Perte d'hétérozygotie | 577 | 60,3 | 274,4107 |
| Diploïdes | 322 | 33,6 | 387,8671 |
| Gains | 49 | 5,1 | 603,9244 |
| Amplification | 3 | 0,3 | 526,6277 |
| TOTAL | 957 | 100 | |

Figure 40 : altérations du nombre de copies de *NTN1* dans les tumeurs mammaires.

2.3.1.2.3 Autres gènes impliqués dans la voie apoptotique d'UNC5B

On a observé durant l'ensemble de ma thèse un certain nombre d'altérations de la voie pro-apoptotique d'UNC5B, notamment liés à l'hyperméthylation de *NTN1* et de *DAPK1* dans les tumeurs mammaires. Afin d'étudier plus amplement les différents acteurs de cette voie, j'ai

étudié l'expression de *DAPK1*, *NTN1*, *UNC5B*, *CIP2A*, *PP2A* et *PR65 β* dans la cohorte de tumeurs mammaires de TCGA (**Figure 41**).

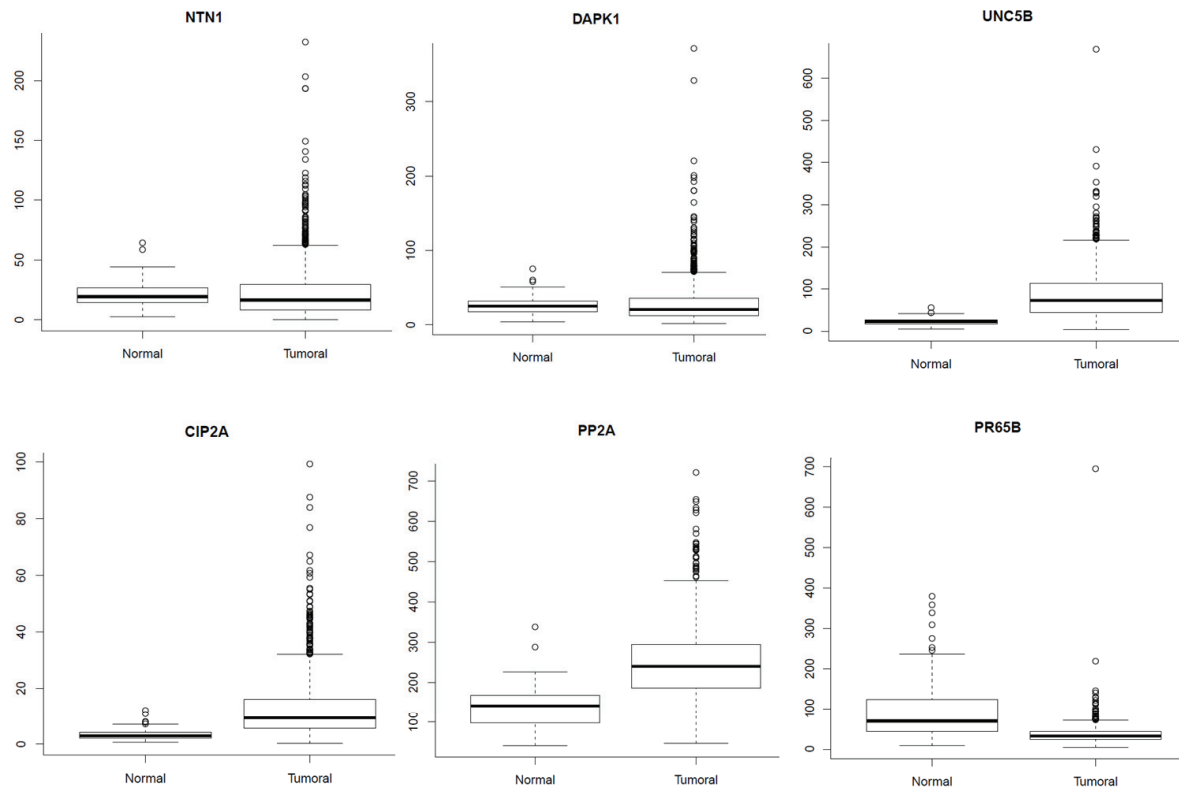
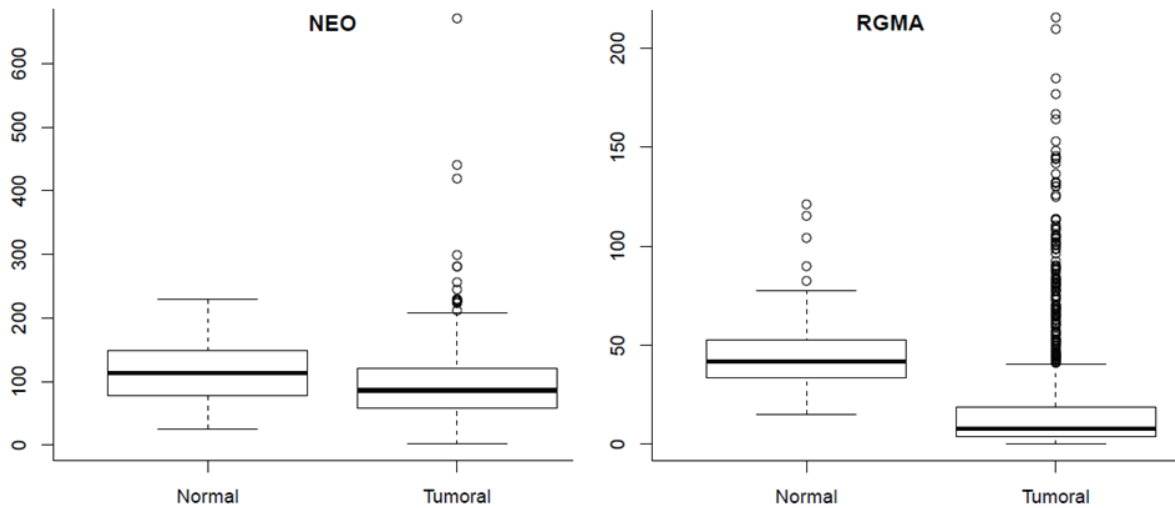


Figure 41 : Altérations de l'expression des gènes de la voie pro-apoptotique d'UNC5B dans les tumeurs mammaires. Les valeurs sont exprimées en RPKM. N=111 et 1048 pour les échantillons normaux et tumoraux, respectivement.

On distingue ici deux types de tumeurs pour l'expression de *NTN1* et de *DAPK1* ; la première montre un profil d'expression du gène relativement similaire voire diminuée par rapport aux tissus normaux, et la seconde largement augmentée vis-à-vis des tissus normaux. Pour *UNC5B*, *CIP2A* et *PP2A*, on observe une légère augmentation des tumeurs par rapport aux tissus normaux. Enfin, *PR65 β* est diminué dans les tumeurs.

Durant mes travaux de thèse, nos collaborateurs ont montré que les récepteurs UNC5B et néogénine (un homologue de DCC) interagissent par l'intermédiaire de la nétrine-1 (Manuscrit Cancer Cell, Figure 2D). En effet, il a été montré que la nétrine-1 possède deux épitopes distincts mais proches capables de lier à la fois les récepteurs UNC5B et Néogénine. Nous avons donc décidé de vérifier les profils d'expression de la néogénine (NEO1) dans les tumeurs mammaires, ainsi que celle de son principal ligand : RGMA. J'ai également vérifié la

relation éventuelle entre l'expression de ces gènes et celle de *NTN1*, *UNC5B* et *DAPK1* (Figure 42).



| GENE A | GENE B | p-Value | Log Odd Ratio | Association |
|--------------|--------------|------------------|---------------|----------------------|
| NTN1 | RGMA | <0.001 | 1.516 | Co-occurrence |
| DAPK1 | RGMA | <0.001 | 2.369 | Co-occurrence |
| NEO1 | RGMA | 0.038 | 0.719 | Co-occurrence |
| NTN1 | DAPK1 | 0.041 | 1.257 | Co-occurrence |
| UNC5B | NEO1 | 0.041 | <-3 | Exclusivité mutuelle |

Figure 42 : Altérations de l'expression des gènes **NEO1** et **RGMA** dans les tumeurs mammaires, et relations avec la voie pro-apoptotique d'**UNC5B**. Les valeurs sont exprimées en RPKM. N=111 et 1048 pour les échantillons normaux et tumoraux, respectivement. L'analyse des relations en termes d'expression a été évaluée à partir des données TCGA de 960 patients, avec un seuil d'expression de ratio 2, soit au moins 100% d'augmentation ou diminution de l'expression génique pour chaque gène étudié.

Ces résultats montrent un lien positif entre expression des ligands nétrine-1 et DAPK1 et RGMA, mais également entre NEO1 et DAPK1. Enfin, NEO1 et UNC5B sont mutuellement exclusifs dans les tumeurs mammaires.

2.3.2 Les autres partenaires de la voie apoptotique d'UNC5B, étude *in vitro*.

Durant ces travaux, très peu d'informations ont été divulguées sur l'expression des autres acteurs de la voie d'UNC5B dans les lignées cellulaires. J'ai souhaité, durant ma thèse, vérifier l'expression de ces gènes et leur réponse éventuelle à un traitement décitabine, afin de valider la spécificité de mon approche. Ainsi, l'expression de *CIP2A*, *PP2A* et *PR65 β* a été testée dans les lignées MDA-MB-231 et H460. Dans ces lignées, *PP2A* et *PR65 β* sont exprimés à des taux relativement faibles, et *CIP2A* est exprimé assez fortement. Aucun de ces gènes ne semble répondre transcriptionnellement aux traitements décitabine, ce qui nous reconforte quant à la spécificité du mécanisme réactivé lors des traitements décitabine, et de la resensibilisation des cellules tumorales aux anticorps anti-nétrine-1 (**Figure 43**).

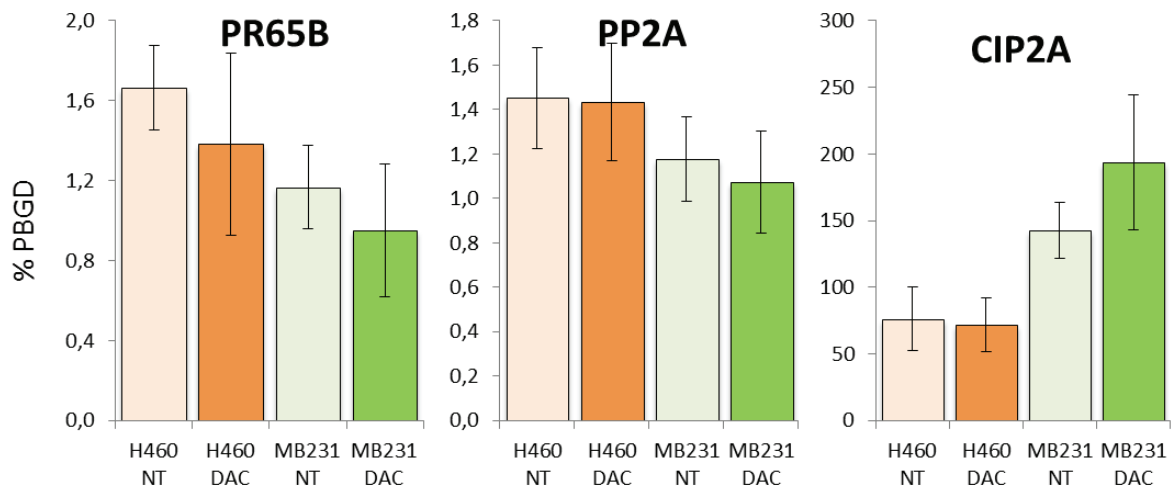


Figure 43 : Expression des partenaires de la voie pro-apoptotique d'UNC5B. Les gènes sont exprimés en pourcentage du gène de ménage PBGD. Les différences entre les différentes conditions ne sont pas statistiques. DAC : décitabine. Les cellules ont été traitées avec 10 μ M de décitabine durant 72h. Les milieux ont été renouvelés chaque jour, et au terme des traitements, les ARN ont été extraits et amplifiés par PCR quantitative.

3 DISCUSSION

3.1 Introduction et résumé des travaux

La voie des récepteurs à dépendance et son implication dans la tumorigénèse a fait l'objet d'un engouement scientifique depuis quelques années ; ces récepteurs transmembranaires ont la particularité d'être actifs à la fois en présence et en absence de leur ligand ; en présence de leur ligand, ces derniers transduisent des signaux favorisant la survie cellulaire, la prolifération et la migration tandis qu'en absence de leur ligand, les récepteurs interagissent avec des protéines pro-apoptotiques, et induisent ainsi la mort cellulaire de manière active. Les récepteurs à dépendance ont tous en commun la propriété fonctionnelle d'induire l'apoptose en l'absence de leur ligand. La famille des récepteurs à dépendance et de leur(s) ligand(s) ne cesse de grandir et compte actuellement une vingtaine de membres [309]. Parmi eux, il existe des récepteurs spécifiques d'un même ligand : la Nétrine-1 [274]. Ces récepteurs appelés DCC (Deleted in colorectal cancer), ainsi que les membres de la famille UNC5 (Uncoordinated): UNC5A à D sont fréquemment perdus dans les cancers, et cette perte fonctionnelle par mutation, délétion ou hyperméthylation de l'ADN est associée à la progression tumorale dans un certain nombre de types de tumeurs dont les cancers colorectaux, mammaires, les neuroblastomes etc [287-289, 239]...

Il existe différents types d'altérations de la voie des récepteurs à dépendance spécifiques de la nétrine-1 ayant été historiquement associés à l'initiation et plus particulièrement à la progression tumorale. En effet, un certain nombre de tumeurs agressives comme les cancers mammaires métastatiques ainsi que les cancers du poumon non à petites cellules voient l'expression du ligand, la nétrine-1 augmentée [290, 288]. A partir de ces observations, des thérapeutiques ciblées ont été développées dans le laboratoire. Plusieurs générations de ces molécules ont été produites, chacune d'entre elles ayant été conçues pour titrer spécifiquement le ligand nétrine-1, bloquant ainsi son interaction avec ses récepteurs qui vont alors transduire activement des signaux d'apoptose. Ces molécules permettraient de rétablir le phénomène de dépendance cellulaire envers la présence de ligand, ce qui représente une perspective thérapeutique particulièrement pertinente pour traiter certains types de cancers. La dernière

génération en date correspond à un anticorps humanisé responsable du blocage de l'interaction nétrine-1/ UNC5B, qui se prénomme NET1-mAb.

Malheureusement, d'autres types d'altérations de cette voie peuvent être observés dans les cancers. Tout d'abord, la surexpression du ligand n'est pas systématique dans les tumeurs même les plus agressives, avec 38,5% des patients qui seraient susceptibles de ne pas répondre au traitement pour l'exemple du cancer du sein métastatique [290]. De plus, un grand nombre d'altérations des récepteurs à dépendance ont été répertoriées, et sont associées à leur perte de fonction pro-apoptotique ou leur perte d'expression [360]. C'est le cas de DCC, fréquemment délété dans les cancers colorectaux, mais également d'UNC5C, fréquemment hyperméthylé dans ces mêmes cancers [287, 239]. Enfin, les partenaires de ces récepteurs à dépendance n'échappent pas aux altérations d'origine génétiques et épigénétiques liées aux processus d'initiation ou de progression tumorale. C'est par exemple le cas du partenaire pro-apoptotique majeur du récepteur UNC5B : la *Death associated protein kinase*, ou DAPK1. Cette protéine, activée par déphosphorylation par l'intermédiaire indirect d'UNC5B est particulièrement importante dans l'induction d'apoptose, mais voit son taux d'expression fréquemment diminué par hyperméthylation de son promoteur dans un grand nombre de cancers tels que les leucémies aiguës [320], et les cancers du sein [361], ou du poumon [51].

La méthylation de l'ADN est l'une des altérations les plus fréquemment associées à des pertes d'expression de gènes suppresseurs de tumeurs dans les cancers, et possède la caractéristique tout à fait étonnante d'être un processus réversible, contrairement aux mutations et délétions.

L'objectif de mon travail de thèse fut de vérifier l'implication de la méthylation dans la répression transcriptionnelle de la voie des récepteurs à dépendance, puis de mettre au point des modèles précliniques visant à réactiver à l'aide d'inhibiteurs de DNMT1 l'expression de gènes cibles hyperméthylés, et ainsi de resensibiliser les cellules tumorales à l'apoptose induite par les anticorps bloquant l'interaction ligand/ récepteur.

Dans un premier temps, nous avons vérifié la véracité de cette hypothèse à l'aide de cohortes de patients atteints de cancers du sein et du poumon non à petites cellules. L'analyse des cohortes TCGA mammaires (N=737) et des tumeurs des poumons non à petites cellules (N=705) indique une hyperméthylation fréquente de *DAPK1* et *NTN1* dans les tissus tumoraux comparés aux tissus normaux adjacents (N=76 et N=107 tissus appariés normal/ tumoral dans le sein et le poumon, respectivement), et une corrélation inverse entre méthylation et expression

(N=737 et N=705 patients dans le sein et le poumon, respectivement). Nous avons donc confirmé l'importance du phénomène chez les patients.

Nous avons ensuite cherché des modèles cellulaires présentant des altérations de la voie pro-apoptotiques d'UNC5B, et de ce fait potentiellement résistants aux traitements anticorps anti nétrine-1. Ainsi, dans les lignées H460, MDA-MB231 et HMLER, la combinaison de traitement décitabine avec un anticorps anti nétrine-1 induit une augmentation de l'apoptose en comparaison avec les traitements simples, et ce phénomène est réversé par ajout de nétrine-1 recombinante en excès.

De plus, dans des lignées stabilisées par shRNA pour la perte d'expression d'*UNC5B* ou de *DAPK1*, la potentialisation de l'apoptose induite par la combinaison DAC + NET-1 mAb est perdue *in vitro*, ce dans les lignées H460 et MDA-MB-231- shRNA. Enfin, les lignées H460-shNTN1 et MDA-MB-231-shNTN1 voient leur taux d'apoptose fortement augmenté par le traitement décitabine seul.

Ces mécanismes ont été également validés *in vivo* dans des modèles de xénogreffes. En effet, de la même manière que les contrôles PBS et IgG contrôle, les traitements simples décitabine ou Net-1 mAb n'entraînent pas de diminution de taux de croissance tumorales. Dans ce contexte, seule la combinaison DAC + Net-1 mAb entraîne une diminution de la croissance tumorale. Cette effet est associé à une augmentation de l'expression de DAPK1, UNC5B et nétrine-1 dans les tumeurs traitées à la décitabine, mais surtout à l'augmentation significative du nombre de cellules apoptotiques dans les tumeurs issues de souris traitées à la combinaison des deux molécules, lorsque comparée à l'ensemble des autres groupes. Nous avons également validé le mécanisme impliqué dans ce phénomène *in vivo*, à l'aide de lignées MDA-MB-231-*shDAPK1*, *UNC5B* et *NTN1* que l'on a greffé dans la glande mammaire de souris nude.

Conformément aux résultats attendus, la perte d'expression de *DAPK1* et *UNC5B* induisent une perte de réponse à la combinaison DAC + Net-1 mAb, et la perte de *NTN1* sensibilise les greffons au traitement DAC seul.

Enfin, un modèle mammaire de xénogreffe dérivée de patient a été utilisé afin de tester l'efficacité anti-tumorale de la combinaison sur des tumeurs établies, et dont l'hétérogénéité structurale et cellulaire est plus représentative de l'environnement tumoral observé chez les patients.

J'ai également effectué, durant ma thèse, différentes études de l'expression génique des différents autres protagonistes de la voie pro-apoptotique d'UNC5B à l'aide des grandes cohortes TCGA. L'essentiel de ce travail a été réalisé sur la cohorte de cancers mammaires, dans laquelle j'ai étudié les altérations génétiques et épigénétiques des différents acteurs de cette voie.

Je décrirai donc dans cette partie les différents mécanismes et altérations de la voie des récepteurs à dépendance spécifiques de la nétrine-1, et tout particulièrement d'UNC5B. Je tenterai alors de replacer mes observations dans un contexte mécanistique lié au développement tumoral.

La méthylation de l'ADN, comme on a pu le décrire dans la partie 2 de l'introduction, ne suffit souvent pas d'elle-même à induire la répression transcriptionnelle. Lorsqu'un promoteur est méthylé, une protéine de liaison dédiée (MBP) peut se fixer sur des CpG méthylés, et recruter des complexes corépresseurs contenant des HDAC et HMT qui vont induire un compactage des nucléosomes, et une répression transcriptionnelle. Je discuterai de quelques résultats très préliminaires suggérant une éventuelle implication de marques épigénétiques répressives dans la régulation transcriptionnelle de mon trio génique favori : *DAPK1/UNC5B/NTN1*.

Enfin, j'évoquerai la pertinence thérapeutique des anticorps Net-1 mAb, en association ou non à des chimiothérapies telles que les inhibiteurs de DNMT1, dont la décitabine fait partie.

Dans les manuscrits soumis aux revues Cancer Cell et EMBO Molecular Medicine, des discussions ont été faites, je ne reviendrai pas sur ces points afin de favoriser la discussion sur d'autres résultats non mentionnés dans les travaux soumis.

3.2 La voie pro-apoptotique des récepteurs à dépendance, mécanismes et altérations dans les cancers

3.2.1 La mort cellulaire induite par les récepteurs à dépendance : questions générales inhérentes au concept.

La notion de récepteur à dépendance a été proposée en 1998, et, depuis, ses contours sont en perpétuelle redéfinition. De nombreuses questions concernant notamment les mécanismes moléculaires et les modes de régulation de leur dualité fonctionnelle demeurent sans réponse.

3.2.1.1 Comment le départ du ligand peut-il induire l'apoptose ?

Le modèle des récepteurs à dépendance implique qu'un récepteur, en l'absence de son ligand, soit capable d'induire la mort cellulaire par apoptose, et ceci de manière active, grâce à la mise en place d'une voie de signalisation négative. Mais comment le retrait du ligand place-t-il le récepteur dans une configuration pro-apoptotique? A ce jour plusieurs hypothèses peuvent être avancées. Une première possibilité est que le ligand, en se détachant de son récepteur à dépendance, induise un changement de conformation tridimensionnelle de la partie intracellulaire du récepteur, qui pourrait permettre :

- (i) d'exposer les sites de clivage par les caspases du récepteur
- (ii) la déphosphorylation de certains résidus importants pour l'initiation de la cascade apoptotique. En ce sens, il a été rapporté que la phosphorylation de l'acide aminé Y1001 de MET est suffisante pour empêcher son clivage par les caspases (Deheuninck et al. 2009) ;
- (iii) d'exposer certaines régions nécessaires au recrutement de partenaires pro-apoptotiques ou au contraire
- (iiii) le relargage de facteurs anti-apoptotiques, comme décrit pour le récepteur UNC5B et le facteur CIP2A.

L'analyse structurale comparative des récepteurs à dépendance, et notamment de mutants « perte de fonction apoptotique », serait un moyen de mieux comprendre les modalités et la

régulation de ce processus et donc, la transition entre les deux états « ON/ON » de ces récepteurs.

3.2.1.2 Existe-t-il un complexe pro-apoptotique commun aux récepteurs à dépendance ?

De nombreux efforts sont en cours au laboratoire pour caractériser les acteurs de la signalisation apoptotique induite par les récepteurs à dépendance. Certaines approches dites «globales» sont actuellement utilisées, notamment des cribles double-hybrides initiés à partir des domaines pro-apoptotiques des récepteurs à dépendance ou des cribles fonctionnels à grande échelle, via l'utilisation de banque de shRNA, permettant la sélection de candidats dont l'inactivation, par ARN interférence, suffit à bloquer l'apoptose induite par les récepteurs à dépendance.

Plus ponctuellement, les données de la littérature (approche candidat) sont utilisées pour identifier certains interactants potentiels des récepteurs à dépendance. C'est ainsi que, pour les récepteurs UNC5B, certains éléments de leur complexe d'activation des caspases (DAPK, PP2A, CIP2A) ont pu être précisés.

Certains de ces acteurs pourraient être impliqués dans l'apoptose induite par d'autres récepteurs à dépendance, laissant présager des mécanismes communs à plusieurs récepteurs. Ainsi la DAPK, participerait notamment à l'apoptose induite par Néogénine [362], un récepteur homologue de DCC.

Néanmoins, il est nécessaire de souligner qu'à ce jour, parmi les partenaires explorés, aucun ne semble commun à tous ces récepteurs. Ceci exclut l'hypothèse de l'existence d'une plateforme d'activation de l'apoptose spécifique aux récepteurs à dépendance, analogue à celle de la voie extrinsèque des récepteurs de mort. On notera d'ailleurs que certains acteurs pro-apoptotiques semblent même spécifiques d'un récepteur à dépendance donné, comme par exemple la protéine NRAGE qui participe à l'apoptose induite par UNC5A mais pas par UNC5B ou C. Cette singularité pourrait prendre tout son sens si on la considère sous l'angle de la fonction de suppresseur de tumeurs des récepteurs à dépendance. En effet, elle pourrait permettre d'ajouter des niveaux supplémentaires de contrôle, visant à bloquer efficacement l'échappement tumoral.

Une meilleure compréhension des voies de signalisation des récepteurs à dépendance apparaît donc nécessaire, d'une part pour identifier de nouveaux gènes impliqués dans la tumorigénèse, mais aussi pour permettre de définir le profil des patients présentant une signalisation apoptotique fonctionnelle dans une perspective thérapeutique.

3.2.1.3 Le clivage intracellulaire des récepteurs à dépendance et activation des caspases: qui de l'œuf ou de la poule ?

On sait que l'activité pro-apoptotique de la plupart des récepteurs à dépendance dépend d'un clivage par des protéases (notamment par la caspase 3 dans des expériences *in vitro*) au niveau de leur domaine intracellulaire [309]. Mais une question demeure : comment le clivage des récepteurs à dépendance par les caspases pourrait être un événement initiateur de la cascade pro-apoptotique, en sachant que l'activation des caspases est reconnue, elle-même, comme un événement terminal de la signalisation de mort cellulaire ?

Une première explication pourrait être que d'autres protéases, comme les calpaïnes par exemple, cliveraient en premier lieu les récepteurs à dépendance. En effet, Waterhouse et collaborateurs ont montré que l'activité protéasique des calpaïnes est inhibée par le z-VADfmk (ce qui pourrait expliquer l'absence de clivage des récepteurs à dépendance observée *in vitro* après traitement au z-VAD-fmk). De plus, de façon intéressante, ils ont montré que l'activation des calpaïnes est un événement survenant avant l'activation des caspases dans un contexte d'induction de l'apoptose en réponses à des radiations [363]. Il est également envisageable que le clivage des récepteurs à dépendance soit médié par un pool de caspases localement activées, mais dont l'activité globale au sein de la cellule est insuffisante pour induire en elle-même son démantèlement [364]. En absence de son ligand, le changement de conformation du récepteur à dépendance (monomérisation par exemple) permettrait l'exposition d'un domaine reconnu par ce pool local de caspases actives, engendrant son clivage puis la mise en place d'une boucle d'amplification entre caspases initiatrices et caspases effectrices. Toutefois, on ne peut exclure l'idée que le recrutement d'un complexe activateur des caspases soit nécessaire pour induire, dans un second temps, l'activation de ces cystéines protéases, de manière analogue à ce qui est observé pour les récepteurs de mort. Les caspases alors activées cliveraient le récepteur facilitant l'exposition de son domaine de mort pour recruter d'autres partenaires capables d'activer les caspases et donc d'amplifier le signal apoptotique.

Comprendre de quelle façon à lieu le clivage intracellulaire des récepteurs à dépendance, et donc l'induction de leur voie de signalisation apoptotique, pourrait permettre de mieux comprendre les conditions dans lesquelles l'absence de leur ligand suffit à déclencher la mort des cellules.

3.2.1.4 Quel est le rôle du fragment « pro-apoptotique » ?

D'autres questions sont soulevées par le clivage intracellulaire de la plupart des récepteurs à dépendance : qu'advient-il du ou des fragments libérés par ces clivages ? Quels rôles jouent-ils dans l'induction de l'apoptose ? Sont-ils impliqués dans d'autres voies de signalisation ?

Dans le cas du récepteur UNC5B, c'est le fragment apoptotique (contenant le Death Domaine) libéré après clivage du récepteur en absence de nétrine-1, qui, associé à la DAPK, est responsable du déclenchement du signal apoptotique [240]. Outre le recrutement du complexe pro-apoptotique, certaines études récentes montrent que ces fragments relargués peuvent participer activement à la voie de signalisation négative des récepteurs à dépendance. Il serait donc intéressant, dans le cas des récepteurs à dépendance à la nétrine-1, de déterminer le rôle des fragments de clivage relargués lors de l'activation de la voie de signalisation négative, afin de mieux comprendre les mécanismes, directs et indirects d'induction de la signalisation apoptotique, ainsi que les phénomènes secondaires associés à l'activité potentielle du fragment de clivage.

3.2.1.5 La mort cellulaire induite par les récepteurs à dépendance est-elle uniquement de l'apoptose ?

Il est possible que d'autres types de morts cellulaires programmées interviennent dans la mort induite par les récepteurs à dépendance. Ainsi, des données bibliographiques permettent de supposer que certains récepteurs à dépendance non liés pourraient induire une mort cellulaire par autophagie. En effet, certains acteurs de la signalisation dite « apoptotique » des récepteurs UNC5H, comme la DAPK, jouent un rôle à la fois dans l'induction de l'apoptose et de l'autophagie [365].

Par ailleurs, nous avons vu dans l'Introduction que p53 occupe une place centrale dans l'orientation du destin de la cellule soumise à différents types de stress cellulaires : arrêt transitoire du cycle, arrêt permanent du cycle (sénescence) ou mort par apoptose. Or, certains

récepteurs à dépendance comme UNC5B sont des cibles transcriptionnelles directes de p53 [283], ce qui soulève la question générale de l'implication des récepteurs à dépendance dans les voies induites par p53, dont celle de sénescence.

Ces notions nécessitent bien sûr d'être analysées et étayées expérimentalement mais illustrent l'importance d'une caractérisation plus précise des changements morphologiques, biochimiques et moléculaires qui accompagnent l'activation de la voie de signalisation négative des récepteurs à dépendance. Dans ce cadre, il serait intéressant de réaliser une étude génomique à large échelle, à l'aide de puces ADN, afin de caractériser dans des cellules primaires exprimant le récepteur à dépendance d'intérêt, les gènes exprimés en présence et en absence de son ligand.

3.2.1.6 La voie de signalisation négative des récepteurs à dépendance suffit-elle à induire l'apoptose des cellules

Une autre question en suspens est celle des conséquences de l'activation de cette voie négative, ou en d'autres termes des conditions dans lesquelles elle suffit à déclencher la mort des cellules.

Dans un contexte cellulaire d'activation globale de voies de signalisation de survie cellulaire, l'activation des caspases par un récepteur à dépendance non lié pourrait être insuffisante pour déclencher la mort cellulaire. Dans ce cas, la signalisation négative des récepteurs à dépendance pourrait avoir un impact local sur le fonctionnement cellulaire, en induisant par exemple le remaniement du cytosquelette d'actine.

En revanche, dans des conditions de stress, l'induction de la voie de signalisation apoptotique des récepteurs à dépendance pourrait être un mécanisme engageant la cellule dans un processus irréversible de mort cellulaire. Dans le même ordre d'idée, il est envisageable que l'induction de l'apoptose par les récepteurs à dépendance soit secondaire à l'activation d'autres mécanismes/voies influençant par exemple le clivage intracellulaire initial du récepteur par les caspases, de façon directe (changement de conformation du récepteur) ou non (activation de partenaires intracellulaires facilitant le recrutement du complexe activateur des caspases et/ou l'accès du pool local de caspases actives au récepteur).

La caractérisation précise de l'impact de stress sur l'expression et/ou l'activité de chacun des récepteurs à dépendance pourrait donc être décisive i) sur le plan de la modélisation in vitro,

pour se situer dans une « fenêtre » propice à l'efficacité maximale de l'induction de l'apoptose par les récepteurs non liés à leur ligand et ii) pour mieux comprendre, de fait, leur rôle physiologique.

3.2.1.7 Comment est régulée la voie de signalisation négative induite par les récepteurs à dépendance ?

La régulation de l'apoptose induite par les récepteurs à dépendance pourrait se faire notamment i) par la modulation directe de l'expression des acteurs de ces voies de signalisation ou ii) via le contrôle de la disponibilité/stabilité de ces protéines.

On notera que de façon générale, aucune étude à large échelle des mécanismes de régulation transcriptionnelle, traductionnelle et post-traductionnelle des gènes codant pour les récepteurs à dépendance et leur ligand n'a encore été réalisée. Cependant, un nombre croissant de données de séquençages haut débit, analyses de méthylation de l'ADN et autres approches à grande échelle sont désormais disponibles, principalement dans les cancers, ce qui nous offre une opportunité fabuleuse de décrypter un certain nombre de ces mécanismes.

3.2.1.8 La voie positive a-t-elle un impact sur la voie négative?

Ligands et récepteurs à dépendance pourraient réguler leur expression de façon réciproque, assurant ainsi un contrôle fin de leur dualité fonctionnelle. En ce sens les travaux de D. Goldschneider au laboratoire ont permis de proposer un mode d'action potentiel du ligand RGMa sur l'inhibition de l'apoptose induite par son récepteur à dépendance Néogénine. En effet, en présence de RGMa, Néogénine est clivée au niveau sous-membranaire par la γ -sécrétase, ce qui libère la quasi-totalité de son domaine intracellulaire (NeICD) doté d'un signal de localisation nucléaire. Au niveau du noyau, le NeICD fixe la chromatine et active la transcription de gènes cibles et pourrait ainsi constituer une boucle de régulation de l'activité des récepteurs à dépendance [366]. Toutefois, l'impact anti-apoptotique potentiel de ces gènes cibles n'a pas encore été démontré.

Enfin, il est possible d'envisager que la voie positive des récepteurs à dépendance, induite par la liaison du ligand, ait par elle-même un effet pro-survie, en plus de l'effet anti-apoptotique résultant du blocage de l'activité des récepteurs à dépendance non liés.

3.2.1.9 Existe-t-il une coopération et/ou une régulation fonctionnelle entre les récepteurs à dépendance ?

La majorité des études concernant les récepteurs à dépendance est focalisée sur la caractérisation d'un seul couple récepteur/ligand. Néanmoins, le recoupement de ces études fait apparaître l'implication de plusieurs couples récepteurs à dépendance/ligand au sein des mêmes tissus mais aussi dans les mêmes contextes tumoraux. Ceci soulève donc la question de l'existence d'une discussion croisée entre les récepteurs à dépendance qui pourrait notamment se traduire par des interactions fonctionnelles entre les différents récepteurs à dépendance et leurs voies de signalisation. De plus, l'expression simultanée, dans une même cellule, de deux récepteurs à dépendance (ou plus) amène à se demander quelle signalisation, positive ou négative, prend le pas sur l'autre lorsque l'un des ligands devient limitant. Réciproquement, il est intéressant de se demander s'il existe un effet synergique lorsque plusieurs types de récepteurs à dépendance sont exprimés en absence de leurs ligands respectifs.

3.2.2 Les différents acteurs de la voie pro-apoptotique d'UNC5B, expression et altérations dans les tumeurs

Le paradigme des altérations de la voie pro-apoptotique d'UNC5B dans les cancers a été posé de la manière suivante : Les cellules tumorales surexpriment le ligand, ou alors subissent des altérations de la voie pro-apoptotique d'UNC5B, qui empêchent l'induction d'apoptose en absence de nétrine-1. Ce phénomène se place très facilement dans les grands principes de sélection des cellules cancéreuses ; en effet, une cellule qui n'a pas accès au ligand meurt par apoptose si la voie UNC5B est fonctionnelle ; ainsi, la pression sélective ne va retenir que les lignées qui se sont adaptées et ont contourné cette voie, soit par production autocrine du ligand, soit par perte de la voie apoptotique.

3.2.2.1 Nétrine-1, gain ou perte dans les tumeurs ?

Il a été montré à plusieurs reprises que la nétrine-1 est surexprimée dans un certain nombre de cancers. J'ai également validé ces observations dans 30% des NSCLC et 17% des

tumeurs mammaires (ratio tumeur/ normal ≥ 2). Souvent, le gain de nétrine-1 est montré comme associé à l'agressivité tumorale [290, 288, 289].

J'ai également pu observer un gain préférentiel de *NTN1* associé à un gain de *DAPK1* et d'*UNC5B* dans les cancers mammaires les plus agressifs : le sous type des tumeurs triples négatives, par rapport aux tissus sains (Cf Figure 38, partie résultats). Dans ces cancers, il semblerait que cette voie soit particulièrement activée, en présence de nétrine-1. Conformément à l'hypothèse des récepteurs à dépendance, la surexpression du ligand favoriserait ici la voie positive d'*UNC5B*, facilitant alors la survie des cellules tumorales ainsi que leur potentiel métastatique. Cette hypothèse nécessite néanmoins d'être validée par des approches plus complètes, comme l'utilisation de modèles cellulaires pour approfondir l'étude des mécanismes impliqués, et notamment la possible discussion croisée entre voies positive et négative du récepteur *UNC5B*, ainsi que leur(s) conséquence(s) sur le développement tumoral.

Néanmoins, dans les tumeurs du poumon et du sein, il semblerait qu'une importante proportion des tumeurs ne subit pas de gain de nétrine-1 (45,5% et 40% des tumeurs mammaires et des NSCLC, respectivement) voire une diminution significative de son expression (37% et 27% des tumeurs mammaires et des NSCLC, respectivement). L'hypothèse associée est que dans ces tumeurs, la voie pro-apoptotique des récepteurs à dépendance, ici d'*UNC5B* serait altérée.

Cependant, certains résultats suggèrent d'autres hypothèses ; en effet, ce gène ne subit que peu de mutations, mais perd très fréquemment un de ses allèles dans les cellules tumorales (près de 60% des tumeurs mammaires ont une perte d'hétérozygotie pour la nétrine-1), et cette perte est associée à une diminution de son expression (Figures 36, 39 et 40 de la partie résultats). Enfin, ce gène est hyperméthylé dans une fraction importante de tumeurs mammaires et pulmonaires.

Ces observations suscitent pour ma part deux hypothèses :

- i) Certaines populations de cellules tumorales ont un plus gros avantage sélectif à contourner l'absence de nétrine-1 en termes d'induction d'apoptose qu'à conserver ce phénomène de dépendance. Dans cette situation, la perte d'expression du ligand est systématiquement associée à la perte de la voie pro-apoptotique, que ce soit au niveau ou en aval du récepteur. En ce sens, les observations faites dans les NSCLC

suggèrent que dans les tumeurs qui n'ont pas de gain de *NTN1*, *DAPK1* est tout de même préférentiellement hyperméthylé et diminué.

- ii) Une autre théorie serait que certaines cellules du microenvironnement tumoral pourraient sécréter localement le ligand, ce qui rendrait la surexpression de *NTN1* moins nécessaire, donc moins sélectionné de manière clonale dans les populations cellulaires tumorales.

Cependant, l'expression de *NTN1* semble directement liée de manière positive à l'expression du GST *DAPK1* dans les tumeurs mammaires (Manuscrit soumis à EMBO (Papier N°2), Figure S1A).

3.2.2.2 DAPK1, gain ou perte dans les tumeurs ?

DAPK1 a été durant longtemps considéré comme un gène suppresseur de tumeur et impliqué dans la surveillance métastatique. Ce gène est fréquemment perdu dans les cancers, et cette perte d'expression est généralement associée à l'hyperméthylation de son promoteur. Durant nos travaux, nous avons montré ainsi que DAPK1 est diminuée d'au moins deux fois chez $\frac{1}{4}$ et $\frac{3}{4}$ des patientes atteintes de cancers du sein, et du poumon non à petites cellules, respectivement. Ainsi, ce gène représente une cible pertinente pour l'utilisation en thérapie d'inhibiteurs de DNMT1, en particulier la décitabine, puisque le traitement à l'agent déméthylant permet une augmentation de ce gène à la fois *in vitro* et *in vivo* dans des modèles de xéno greffes de lignées et de tumeurs de patientes.

Néanmoins, environ 16% des tumeurs mammaires ont été montré comme surexprimant *DAPK1*. J'ai également montré que dans les tumeurs triple-négatives, *DAPK1* est globalement surexprimé par rapport aux tissus normaux. Cette surexpression est associée à la surexpression de *NTN1*, ce qui suggère l'existence d'une régulation commune entre ces deux gènes. Cela signifie également que dans ces cas, le traitement aux anticorps développés dans le laboratoire est susceptible de représenter un intérêt thérapeutique. En ce sens, il a été montré que *DAPK1* favorise la croissance tumorale et l'agressivité des tumeurs déficientes en p53, en particulier les tumeurs mammaires triple négatives (dans lesquelles p53 est muté dans 80% des cas) [367]. Dans ce papier, le modèle proposé est le suivant : dans les cellules tumorales exprimant normalement p53, DAPK1 peut activer ce dernier en cas de stress cellulaire, induisant ainsi l'expression de gènes cibles de p53 impliqués dans l'apoptose, et

menant ainsi à la mort cellulaire par apoptose. En absence de stress, DAPK1 régule la formation d'un complexe TSC1/ TSC2 (tuberous sclerosis complex 1 et 2) dans la voie mTOR, ce qui favorise la croissance cellulaire, ainsi que l'équilibre entre survie cellulaire et signaux de mort. A l'inverse, dans les cellules p53 mutées, le gain d'expression de DAPK1 ne permet pas de transduire des signaux pro-apoptotiques, puisque p53 ne peut plus activer ses gènes cibles ; on assiste alors à une activation médiée par DAPK1 de voies de croissance cellulaire. Ce système demeure toutefois à valider. Je n'ai, en effet pas obtenu de résultats similaires, notamment sur la croissance tumorales dans des modèles de xéno greffe de cellules mammaires triple négatives MDA-MB-231-shDAPK1 (stables, non inductibles contrairement à leur modèle inductible par traitement doxycycline). De plus, les résultats que j'ai obtenus *in vitro* dans les modèles MDA-MB-231 shDAPK1 mais également H460 (une lignée de NSCLC sauvage pour p53) suggèrent que même si effectivement l'expression de DAPK1 pourrait, dans un contexte p53 muté, favoriser la croissance cellulaire, ce phénomène ne représenterait pas le mécanisme majeur impliqué dans ce processus. Mon opinion personnelle est donc que la voie apoptotique médiée par UNC5B représenterait un mécanisme plus fréquent/ dominant sur d'autres mécanismes. Cela n'altère en rien la possibilité de voir plusieurs mécanismes concomitants dans lesquels DAPK1 jouerait un rôle central, et dont les altérations participeraient au développement tumoral, notamment dans l'exemple des cancers mammaires triple-négatifs. Il s'agirait alors d'un équilibre entre les différentes voies médiées par DAPK1, qui pourrait basculer vers une voie ou une autre dans les cancers, selon des mécanismes à identifier, et qui mènerait l'induction de différentes altérations des voies cellulaires alors activées. Ces résultats méritent d'être confirmés par l'utilisation de plusieurs modèles cellulaires présentant ou non des mutations p53, ou alors un modèle cellulaire unique que l'on muterait pour p53 et comparerait à la même lignée non mutée. L'utilisation de shRNA dirigés contre les différents acteurs décrits plus tôt permettrait par exemple de mieux comprendre ce mécanisme, et l'utilisation de ces lignées en xéno greffe, suivies de différents traitements notamment à l'aide d'anticorps anti-nétrine-1, et/ ou d'inhibiteurs de DAPK1 suivis de marquage immunohistochimiques des tumeurs permettrait peut-être de mettre en évidence une hiérarchie potentielle en termes de réponse antitumorale (inhibition de la croissance tumorale) et d'induction d'apoptose (marquages TUNEL et caspase-3 clivée) entre ces différents mécanismes d'altérations.

3.2.2.3 UNC5B, gain ou perte dans les tumeurs ?

Ce récepteur, à l'image des récepteurs à dépendance, représente un GST conditionnel ; en effet, en présence de son ligand, ce dernier va transduire des signaux positifs facilitant la survie des cellules tumorales, mais également adopter une conformation intracellulaire bloquant l'accès à son domaine de mort, et empêchant l'activation de DAPK1 par recrutement de la protéine anti-apoptotique CIP2A. A l'inverse, en absence de ligand, UNC5B va être monomérisé, ce qui entraîne un changement de conformation intracellulaire qui va démasquer son domaine de mort. Ce phénomène va alors avoir pour conséquence le départ de CIP2A et le recrutement subséquent du complexe PP2A/ PR65 β qui va activer DAPK1 par déphosphorylation. DAPK1 va alors activer les caspases effectrices, et c'est ainsi que meurt la cellule. UNC5B est perdu dans différents types tumoraux comme les cancers gastriques et colorectaux. Lorsque le récepteur est altéré, les cellules se rendent indépendantes de la présence du ligand, mais perdent également la transduction de signaux positifs en présence de nétrine-1.

Les travaux menés par notre groupe ont permis de montrer que dans les cancers des poumons, UNC5B est préférentiellement perdu, mais pas dans les cancers mammaires ; à l'inverse, son expression semble plutôt légèrement gagnée dans les tumeurs du sein, ce qui conceptuellement suscite un questionnement.

Les travaux effectués par nos collaborateurs ont par ailleurs permis de d'observer un rôle du binôme UNC5B/ nétrine-1 dans l'adhérence cellulaire, de manière indépendante des intégrines. On peut imaginer que l'équilibre de liaison UNC5B/nétrine-1 peut être altéré dans les cancers, ce qui pourrait entraîner une perte d'adhérence cellulaire. Si ce contexte est associé à une perte de la voie apoptotique en aval du récepteur, cela conférerait un avantage sélectif de migration aux cellules tumorales, augmentant potentiellement leur potentiel de dissémination. Ce phénomène peut bien évidemment être préférentiellement mis en place dans un type de cancer donné, et pas dans un autre, en fonction du microenvironnement associé, de la sélection clonale, etc... Ces hypothèses nécessitent bien sûr d'être vérifiées par un certain nombre de tests fonctionnels, notamment de migration cellulaire...

3.2.2.4 CIP2A, PP2A PR65 β

CIP2A est un oncogène dont la fonction cellulaire est d'inhiber PP2A, bloquant ainsi la mort cellulaire. Ce dernier voit son expression augmentée dans différents cancers comme par exemple 40% des cancers du sein en général, 64% des tumeurs de type triple négatives et 79% des métastatiques, mais également dans les tumeurs gastriques [297]. Ces résultats ont été validés sur la cohorte mammaire TCGA, avec une augmentation globale de l'expression de ce gène. De plus, une amplification génique de CIP2A a été observée dans la cohorte TCGA de carcinomes pulmonaires squameux, pour environ 10% des tumeurs.

L'activation de la DAPK en aval d'UNC5B est médiée par la protéine phosphatase PP2A, capable de former différents complexes. Ces holoenzymes sont hétérotrimériques, et composées d'une sous unité échafaudage (PR65 α ou β), d'une sous unité catalytique associée à une sous unité régulatrice. PP2A, avec PP1, est responsable de 90% de l'activité sérine/thréonine kinase cellulaire [368], et de ce fait, exerce un rôle dans un grand nombre de voies de signalisations comme par exemple le cycle, le métabolisme, la migration et la survie cellulaires. Cette protéine est connue pour son activité suppressive de tumeur. Durant mes travaux, j'ai observé non pas une baisse des transcrits PP2A (ce que l'on attend généralement d'un GST) mais un gain dans les tumeurs mammaire, en comparaison avec les tissus normaux (Figure 41 partie résultats non publiés).

En ce sens, il a été montré que PP2A aurait également un rôle oncogénique, notamment pas son implication bivalente en tant que facteur pro-apoptotique et anti-apoptotique, selon l'assemblage des holoenzymes qui le composent, et la voie ciblée. Ainsi, il se peut que cette protéine ait un rôle de Dr. Jeekyll et Mr. Hyde dans les cancers, ou comme le cite le papier, de loup déguisé en brebis. A l'inverse, sa sous unité PR65 β est perdue dans les tumeurs mammaires en comparaison aux tissus normaux. Une des hypothèses que l'on peut avancer ici est que cette sous unité participe à l'activité pro-apoptotique des cellules, et serait donc préférentiellement perdue dans ces tumeurs.

3.2.2.5 p53

Comme vu précédemment, il a été montré qu'UNC5B est une cible transcriptionnelle directe du facteur de transcription (FT) p53 [283]. Il est donc envisageable que l'expression et l'activité apoptotique des récepteurs UNC5H et/ou d'autres récepteurs à dépendance soient en

partie régulées par le gardien du génome qu'est p53. Cependant, comme évoqué dans la partie DAPK1 ci-dessus, l'importance fonctionnelle de la régulation de la voie (des voies) d'UNC5B reste à mesurer. Enfin, les données concernant les FT impliqués dans la régulation de l'expression des récepteurs à dépendance restent parcellaires. L'analyse *in silico* des promoteurs de ces gènes, et l'identification des FT impliqués dans leur régulation doit donc être poursuivie afin de mieux cerner leur fonctionnement selon le contexte cellulaire.

3.2.2.6 Néogénine et RGMA

Comme évoqué précédemment, il a été montré que le récepteur à dépendance néogénine, un homologue de DCC, est capable d'induire lui aussi l'apoptose via DAPK1 [362]. De plus, nos travaux suggèrent une interaction néogénine/nétrine-1/UNC5B, *in silico*. L'affinité de ce récepteur pour le ligand nétrine-1 a été longuement débattue durant les années 2000 ; il semblerait que ce récepteur ait une forte affinité pour son ligand RGMA, et que ce soit cette affinité qui est responsable de l'activité récepteur à dépendance de cette protéine transmembranaire. Pour autant, la démonstration d'une affinité plus faible mais existante pour la nétrine a été également démontrée, et le switch de ces différents ligand interviendrait dans l'attraction/ répulsion des neurones, favorisant ainsi leur migration durant le développement embryonnaire [369].

J'ai montré durant mes travaux l'existence d'une concomitance d'expression entre *DAPK1* et *NTN1* dans les tumeurs mammaires; et nos collaborateurs ont montré, dans le papier N°1 accepté dans *Cancer Cell*, que la nétrine-1 possède bel et bien un site d'interaction pour le récepteur néogénine, différent du site d'interaction d'UNC5B, ce qui suggère une possible interaction concomitante des deux récepteurs avec le ligand nétrine-1. J'ai donc souhaité poursuivre ces travaux en évaluant l'existence d'un lien éventuel avec la néogénine (NEO1) et son principal ligand, *RGMA*. Les résultats obtenus montrent des liens positifs d'expression entre *NTN1*, *DAPK1* et *RGMA*, mais également entre *DAPK1* et *NEO1*. Enfin, une exclusivité mutuelle est observée entre les deux récepteurs *NEO1* et *UNC5B* (**Figure 44**).

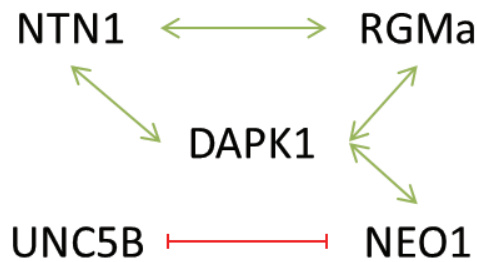


Figure 44 : Régulation croisée entre les voies des récepteurs à dépendance UNC5B et Néogénine.

Ces résultats préliminaires semblent étayer l'existence d'une relation probable entre les deux voies des RD UNC5B et néogénine dans les cancers mammaires, mais pas dans les tumeurs pulmonaires, et qui nécessiterait d'être éclaircie. La relation négative entre les deux récepteurs suggèrent qu'ils sont en compétition, à la fois pour l'interaction avec le ligand nétrine-1 mais également avec le partenaire pro-apoptotique DAPK1. Ce résultat préliminaire obtenu à partir de cohortes de patients représente une hypothèse à vérifier dans des lignées cellulaires, et surtout nécessite une analyse approfondie du mécanisme de bascule entre un récepteur (UNC5B par exemple) et l'autre (néogénine), et également de l'implication de ce phénomène dans différents processus tumoraux (perte d'adhérence, prolifération cellulaire, inhibition de l'apoptose etc...).

Ce mécanisme permettrait de comprendre les résultats obtenus à partir des cohortes mammaires ; en effet, dans ces tumeurs, *NTN1*, *DAPK1*, et *NEO1* ne sont pas gagnés, et *RGMa* est perdu, à part dans une petite proportion de tumeurs. Ces quatre gènes ont une expression co-occurente dans ces tumeurs. A l'inverse, UNC5B, qui a une relation de mutualité exclusive avec la néogénine est gagné. Dans ce contexte, chez les patientes, certaines cellules tumorales subissent une baisse du ligand RGMa, ce qui pourrait entraîner une interaction préférentielle entre les récepteurs néogénine et UNC5B via la nétrine-1 coté extracellulaire, et DAPK1 coté intracellulaire. Dans cette situation, DAPK1 est recruté, soit par néogénine soit par UNC5B, ce qui diminuerait ses possibilités d'activation. Tout ceci est très hypothétique et nécessiterait un assez grand nombre d'expériences de validations, notamment dans des modèles cellulaires.

3.2.2.7 Conclusions

Plus on décortique cette voie, plus l'implication d'une multitude de signalisations semble intervenir dans la voie pro-apoptotique d'UNC5B. Il paraît désormais judicieux d'évaluer l'importance des altérations de ces protéines dans le contexte de la voie pro-apoptotique d'UNC5B, afin de mieux anticiper la survenue éventuelle de résistances aux anticorps anti-nétrine-1, combinés ou non à la décitabine, chez les patients. Un premier coup d'oeil consisterait à évaluer les interactions protéine - protéine de ces différentes voies à l'aide d'outils tels que cbiportal. Comme je l'ai fait pour évaluer les éventuelles co-expression ou exclusions mutuelles entre les *NTN1*, *DAPK1*, *UNC5B*, *NEO1* et *RGMA*, nous pourrions facilement évaluer les tendances, - dans différents types tumoraux-, des tumeurs à co-réguler préférentiellement telle ou telle voie, et ainsi tenter d'ériger un réseau que l'on validerait par des études fonctionnelles par la suite.

3.3 Altérations épigénétiques de cette voie dans les cancers

La répression transcriptionnelle liée à des modifications des profils épigénétiques d'une cellule est un phénomène multifactoriel. La méthylation de l'ADN est couramment perçue comme un signal, qui nécessite d'être interprété pour induire une variation de la transcription d'un gène par exemple. Ainsi, les protéines MBP, dont MBD2 fait partie, sont capables de lier l'ADN méthylé et de recruter des complexes corépresseurs pouvant contenir des HDAC et des HMT qui vont alors initier la répression transcriptionnelle via le compactage des nucléosomes vers ce locus (**Figure 45**). Durant mes travaux, l'altération épigénétique principalement étudiée fut la méthylation de l'ADN. L'hyperméthylation des promoteurs de gènes de la voie pro-apoptotique du récepteur à dépendance UNC5B, et de ses conséquences fonctionnelles en termes de développement tumoral à la fois chez les patients, dans des lignées cellulaires et dans des xénogreffes de tumeurs fraîches de tumeurs mammaires.

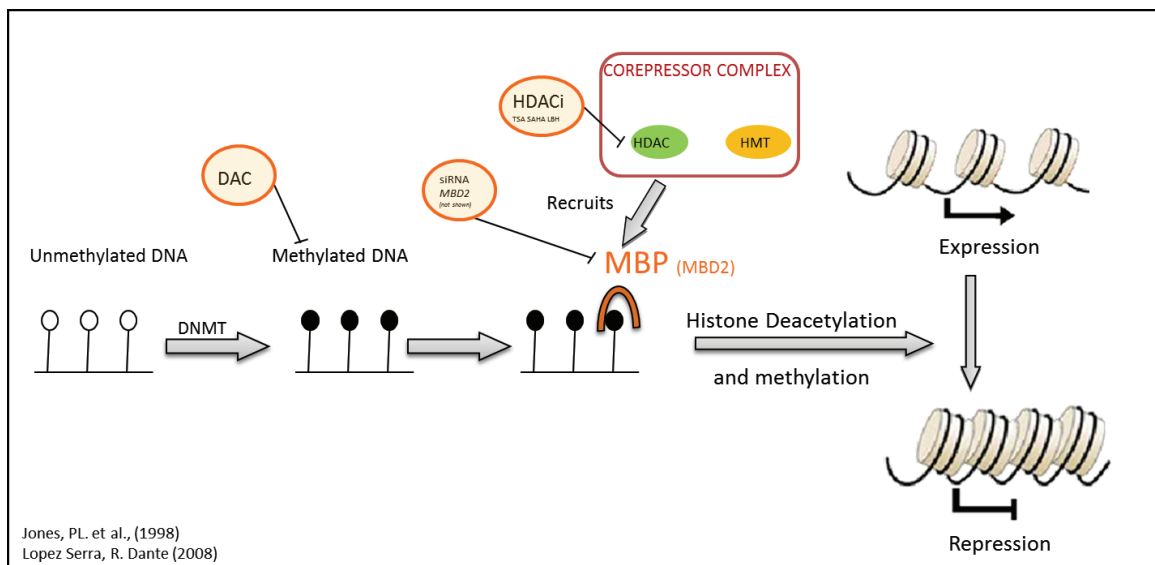


Figure 45 : Schéma simplifié de la mise en place de répression transcriptionnelle, et des différents drogues pouvant affecter ce système. Lorsqu'un promoteur est méthylé, une protéine de liaison dédiée peut se fixer sur des CpG méthylés, et recruter des complexes corépresseurs contenant des HDAC et HMT qui vont induire un compactage des nucléosomes, et une répression transcriptionnelle. Il existe des drogues capables de contrer ce phénomène à différents niveaux ; la décitabine (DAC) est capable d'inhiber la méthylation, une approche de siRNA dirigés contre les MBP va permettre de lever la fixation de ces protéines que les CpG méthylés, et les inhibiteurs de HDAC (trichostatine A, SAHA, panobinostat par exemple), vont empêcher le compactage des nucléosomes.

3.3.1 La méthylation de l'ADN

3.3.1.1 Méthylation de l'ADN et répression transcriptionnelle, des résultats pas toujours très clairs

On l'a vu, la méthylation de l'ADN joue un rôle dans la régulation transcriptionnelle de *NTN1* et *DAPK1* dans les cancers mammaires et NSCLC.

Pour *UNC5B*, ce dernier ne présentait pas de profil méthylé dans les lignées que l'on a travaillé (**Figure 46**). Pour autant, le traitement décitabine dans la lignée MDA-MB-231 n'exprimant pas ce récepteur a induit une augmentation significative de son expression. L'hypothèse formulée est que ce phénomène résulterait d'une régulation indirecte. En ce sens, il a été montré par Guillaume Devailly, au sein de notre équipe, que le traitement décitabine induit certes une augmentation de l'expression d'un grand nombre de gènes, mais également

la répression transcriptionnelle de nombreux gènes (Voir article en Annexe). On peut expliquer ce phénomène par la réinduction de facteurs régulateurs de l'expression de gènes lors des traitements décitabine, ce qui va induire un certain nombre de modifications de l'expression de ces gènes, notamment leur répression. Ce phénomène indirect est peut être lié à l'observation de l'augmentation d'UNC5B dans la lignée MDA-MB-231, bien que son promoteur ne soit pas méthylé. A l'inverse, le traitement décitabine induit une baisse d'expression d'*UNC5B* dans la lignée HMLER, et de manière intéressante, il existe une petite séquence codant pour un ARNm antisens d'UNC5B au niveau de son premier intron. Cette séquence est méthylée dans la lignée HMLER. De plus, le traitement décitabine induit une augmentation des transcrits UNC5B-Antisens de Log2 ratio 3.4 dans ces cellules, mais pas dans les cellules MDA-MB-231 (résultats issus de séquençage des ARN totaux dans des HMLER non traitées ou traitées à la décitabine durant 72h). L'expression des ARN antisens est souvent liée à la répression transcriptionnelle du gène qu'elle cible ; ce phénomène pourrait également expliquer en partie les observations faites sur la régulation de l'expression d'UNC5B dans les lignées traitées à la décitabine, mais nécessite d'être validé par des expériences plus approfondies.

Methyl - capture

Approche globale et
Semi- quantitative

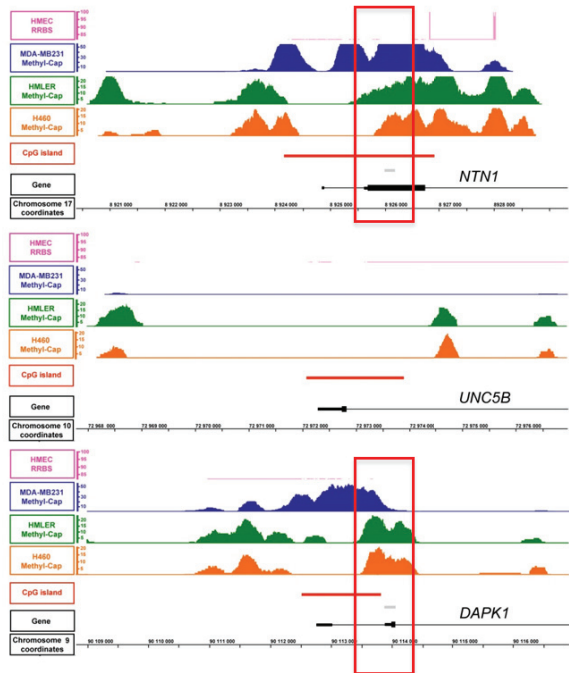
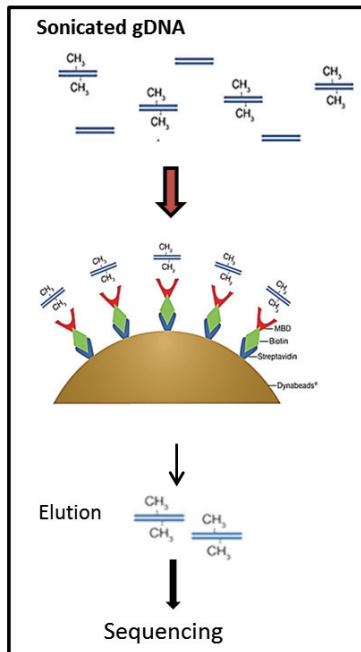


Figure 46 : approche d'évaluation et profils de la méthylation de l'ADN au niveau des promoteurs *NTN1*, *UNC5B* et *DAPK1* dans les lignées H460, MDA-MB-231 et HMLER.

3.3.1.2 Décitabine et déméthylation, un mécanisme peu connu

3.3.1.2.1 Un mécanisme d'action connu, un effet sur les CpG moins bien défini

Conformément à sa fonction inhibitrice de DNMT1, la décitabine est admise en tant qu'agent déméthylant. Malheureusement, peu de choses sont connues sur la manière dont se met en place la déméthylation dans des cellules traitées à la décitabine. Ce que j'ai pu retenir de mes expériences avec cette molécule, c'est tout d'abord :

- i) Que les lignées sont plus ou moins sensibles à cet agent ; en effet, le traitement décitabine, comme d'autres épidrogues, est toxique pour les cellules et peut induire notamment un arrêt du cycle cellulaire et de l'apoptose.
- ii) De ce fait, l'hypométhylation induite via le traitement décitabine entraîne une détection de la baisse plus ou moins forte de la méthylation de l'ADN à l'échelle globale (**Figure 47**).

- iii) Que la perte de méthylation par traitement décitabine semble être effectuée sur l'ensemble des CpG situés dans de petites zones d'îlots CpG relativement peu riches en CpG (voir Figure S1 du manuscrit N°2 sur le cancer du sein, en revue à EMBO MM).

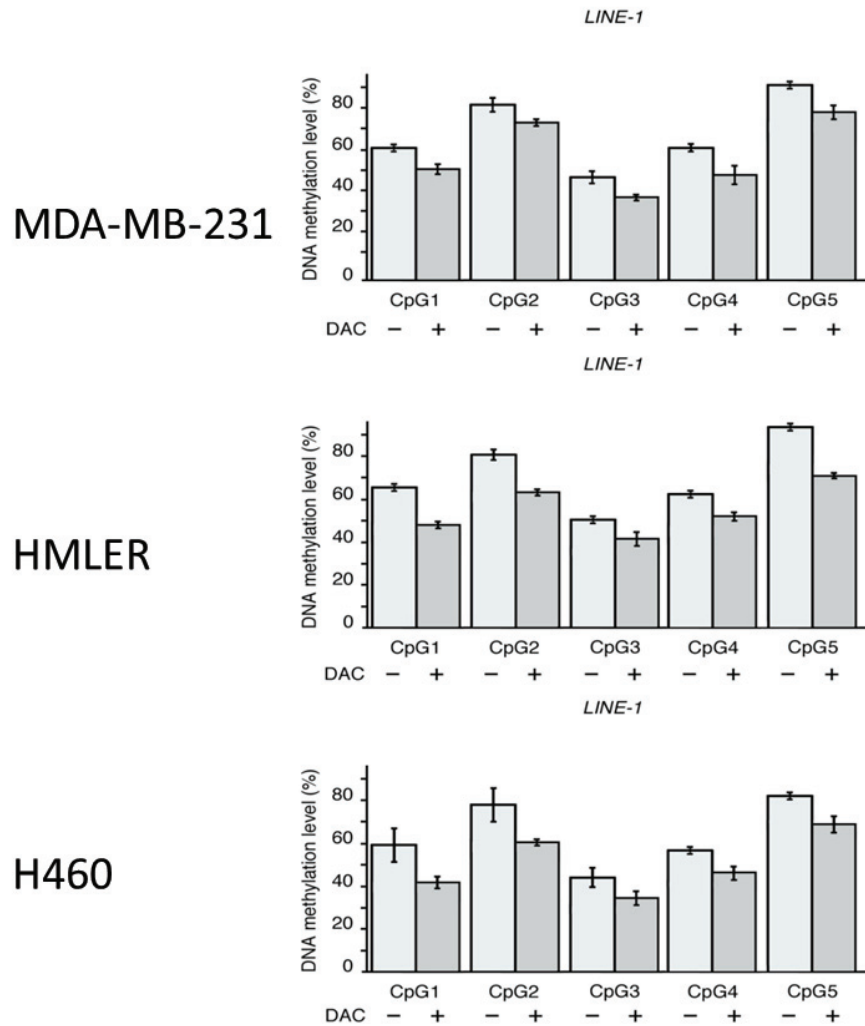


Figure 47 : Profils de perte de méthylation à l'échelle du génome, testé par pyroséquençage des éléments répétés LINE-1 dans les modèles cellulaires MDA-MB-231, HMLER et H460.

3.3.1.2.2 Décitabine et doses, un débat et des hypothèses

Par définition, la présence de décitabine sur la structure double hélice de l'ADN induit la formation d'adduits d'ADN, qui fragilisent la double hélice.

La grande majorité des études de la méthylation sont faites à partir d'ADN bisulfité. Le bisulfite consiste en une désamination des cytosines non méthylées en uracile ; les cytosines méthylées ne sont pas modifiées, ce qui permet de les différencier (**Figure 48**). Cette technique est l'une des bases de l'analyse de la méthylation ; on la retrouve dans le pyroséquençage, le RRBS (Reduced representation of bisulfite sequencing), ou l'ensemble des puces de méthylation (Illumina 450K) utilisées pour la caractérisation des profils de méthylation des tumeurs issues des cohortes TCGA... D'un point de vue technique, le traitement bisulfite implique un traitement de l'ADN à l'acétate de sodium, et à la soude. Ces traitements induisent des cassures de l'ADN. Si l'on considère un CpG sur lequel la DAC a remplacé la cytosine 5 ; la portion d'ADN qui l'entoure est potentiellement fragilisée, notamment par la présence de ce groupement inopportun qui peut entraîner la formation d'adduits de l'ADN. Si l'on traite cet ADN une fois extrait avec de la soude, on peut aisément imaginer que les cassures de l'ADN induites par la soude s'opéreront préférentiellement sur les zones fragilisées de cet ADN. Par conséquent, on biaise potentiellement le résultat en sous estimant la déméthylation induite par le traitement décitabine.

J'ai abordé ce sujet car dans la littérature, les opinions divergent quant à l'efficacité de la décitabine à forte dose. En effet, certains groupes de chercheurs ont montré qu'une exposition plus longue à de faibles doses de décitabine permettrait d'engendrer une meilleure perte de méthylation que des expositions plus standards, comme celle largement utilisée durant mes travaux *in vitro* (10 μ M, 72h) [198].

En effet, si l'on diminue la dose de traitement, la toxicité de ce traitement est également diminuée ; les cellules se divisent plus et incorporent donc mieux la décitabine présente dans le milieu. Les doses utilisées par ce groupe, et depuis par d'autres, sont néanmoins de l'ordre de 10nM (soit 100 fois moins que celle utilisée durant ma thèse).

Par contre, si la dose est plus forte, l'exposition est également augmentée. La décitabine est une molécule instable [370], on peut donc imaginer qu'un traitement décitabine représente également une course contre la montre entre dégradation de la molécule par son instabilité en solution aqueuse, et effet déméthylant sur l'ADN cellulaire, le tout en maîtrisant au mieux la

toxicité. J'ai donc mis au point et comparé un assez grand nombre de techniques de bisulfite et PCR durant ma thèse, afin de tenter de vérifier cette hypothèse.

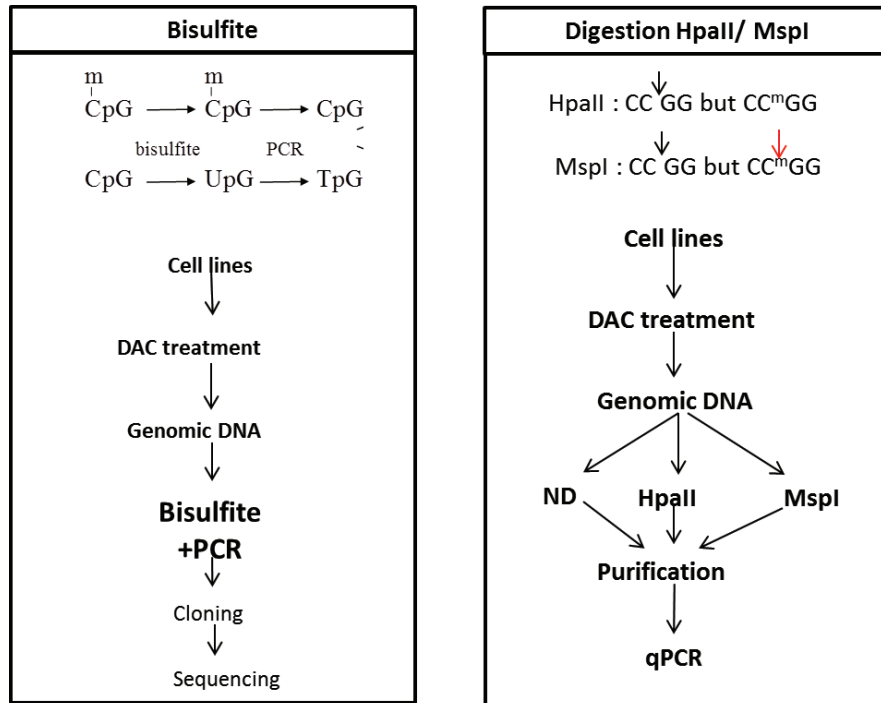


Figure 48 : Principe du bisulfite et de la digestion HpaII/ MspI pour l'analyse de la méthylation

Il existe un type d'expérience permettant de mesurer le taux global de méthylation de l'ADN sans passer par un traitement au bisulfite ; il s'agit de la digestion HpaII/ MspI (**Figure 48**). Durant ma thèse, nous avons montré, avec Guillaume Devailly que des cellules HMLER traitées à 10µM de décitabine durant 3 jours ont un profil déméthylé (**Figure 49**).

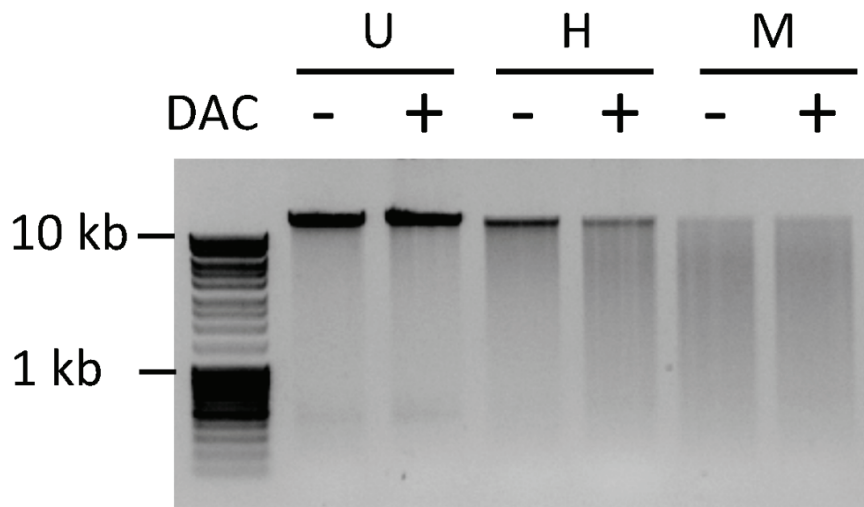


Figure 49 : le traitement décitabine induit une déméthylation de l'ADN. 1 µg d'ADN génomique non digéré (U), ou digéré par HpaII (H) ou MspI (M) a été posé sur gel d'agarose. DAC : décitabine.

D'autres analyses de la méthylation par COBRA (Combined bisulfite restriction analysis) en utilisant des amorces spécifiques des séquences (bisulfitées) des éléments répétés LINE-1 effectués durant ma thèse montrent un profil dose dépendant de perte de méthylation dans les lignées HMEC-hTERT et HMLER (**Figure 50**).

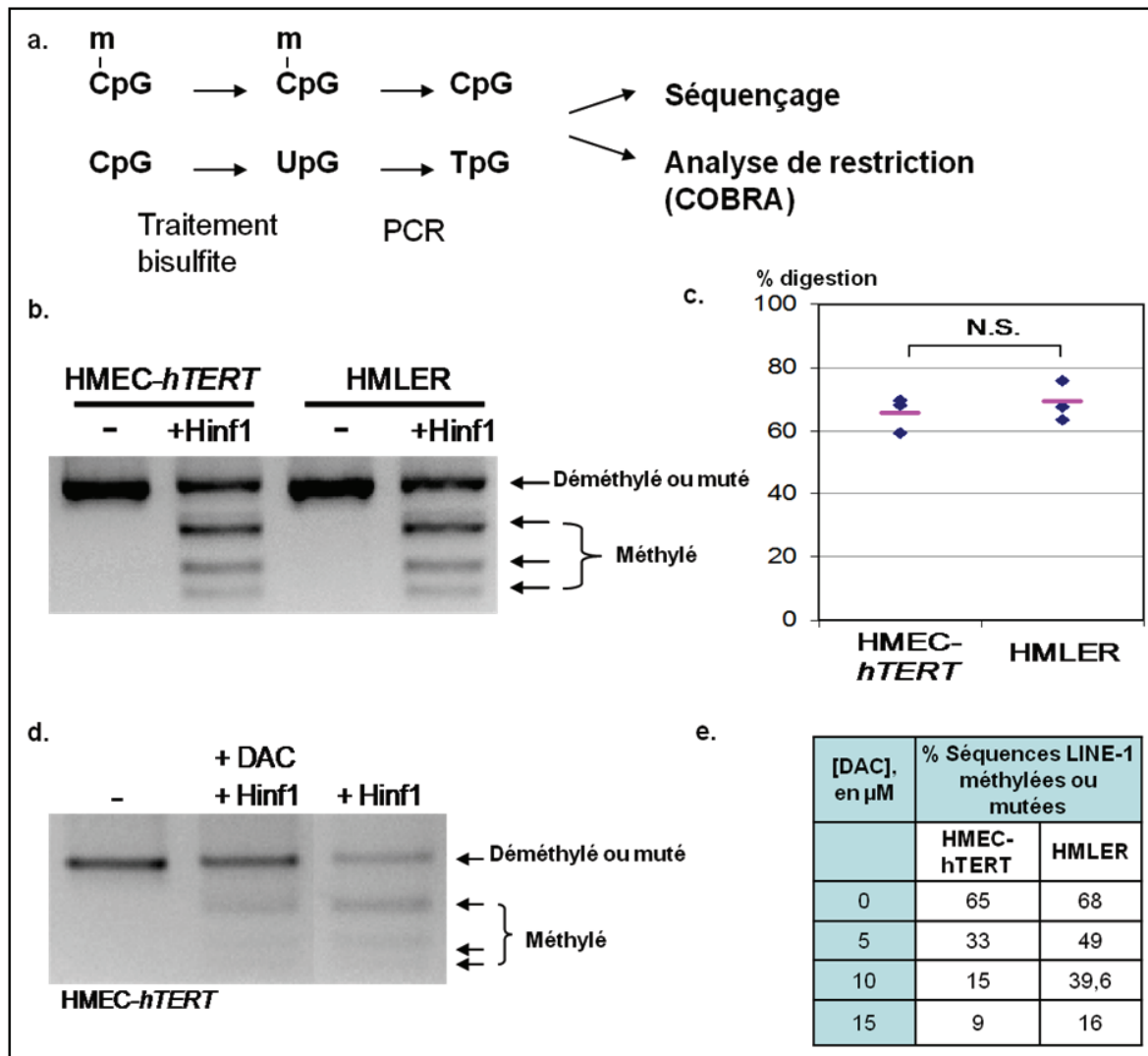


Figure 50 : Détermination du taux global de méthylation des séquences LINE-1. **a.** Principe du traitement au bisulfite de sodium **b.** Produits PCR d'ADN « bisulfité » HMEC-*hTERT* et HMLER avant et après digestion par l'enzyme *Hinf1*. **c.** Représentation graphique du pourcentage d'ADN « bisulfité » digéré par *Hinf1* dans les cellules HMEC-*hTERT* et HMLER. **d.** Effets de la déméthylation sur les cellules HMEC-*hTERT*. **e.** Evolution du taux de méthylation des séquences LINE-1 après traitement des cellules avec des concentrations croissantes de décitabine.

Enfin, les données de séquençage moyen débit (Roche 454) que nous avons obtenu sur des produits PCR d'ADN bisulfité m'ont permis de valider la pertinence des dosages décitabine utilisés durant la majeure partie de mes travaux. Cette dose avait été initialement choisie pour sa capacité de réinduction des gènes de la voie des récepteurs à dépendance *DAPK1*, *UNC5B* et *NTN1*, et j'ai finalement pu montrer une efficacité de déméthylation de l'ordre de 50% *in vitro* pour *DAPK1* et *NTN1*, et de 15 à 25% *in vivo*.

Ce résultat est très intéressant car, à ma connaissance, peu de preuves de la perte de méthylation de l'ADN suite à des traitements décitabine (à doses thérapeutiques) ont été rapportées sur des études *in vivo*.

3.3.1.2.3 Décitabine et ciblage thérapeutique de voies réactivées par hypométhylation.

A ma connaissance, les combinaisons thérapeutiques utilisant la décitabine sont généralement basées sur l'utilisation d'agents chimio-thérapeutiques courants, ou d'inhibiteur de HDAC. Il existe cependant une étude, présentée à l'oral lors d'un congrès, et basée sur le fait que la décitabine induit des dommages à l'ADN qui sont reconnues par des complexes de réparation. En utilisant des inhibiteurs de PARP, une protéine étroitement liée à la réparation de l'ADN, on peut augmenter l'efficacité des traitements pour les leucémies myéloïdes à mauvais pronostic [371].

Une autre étude montre dans un modèle de transformation tumorale que le promoteur de *TRAIL* est hyperméthylé durant la transformation des cellules et que la décitabine réinduit l'apoptose via la réinduction de l'expression de *TRAIL in vitro*. Dans ce modèle cellulaire xénogreffé, le traitement décitabine à 1.5 mg/kg (soit près de quatre fois la dose utilisée durant nos travaux) induit une diminution de la croissance tumorale [352].

De manière très générale, l'une des questions récurrentes que l'on a pu me poser durant mes quelques élocutions est la suivante : la décitabine déméthyle l'ADN de manière aspécifique; ainsi le traitement décitabine ne peut-il pas réinduire d'autres voies que celle des récepteurs à dépendance dans les cellules ? La réponse est évidemment oui ; la décitabine permet d'hypométhyliser les cellules qui se divisent. Nous avons cependant obtenu des résultats montrant que le traitement décitabine, à des doses thérapeutiques, ne suffit pas à inhiber significativement la croissance tumorale dans les modèles de xénogreffes H460, MDA-MB-231 ainsi que les tumeurs mammaires dérivées de patientes (PDX). De plus, les molécules cytotoxiques ciblant les cellules en division sont fréquemment utilisées en chimiothérapie. Enfin, les cellules traitées à la décitabine survivent de manière physiologique ; une balance régulatrice de l'expression génique est probablement mise en place, comme le suggèrent les résultats obtenus par RNA-seq de cellules HMLER traitées ou non à la décitabine publiés dans la revue *Nucleic Acid Research* par notre groupe [66]. Dans ce papier, il est montré que durant la transformation cellulaire, les profils de méthylation de l'ADN sont relativement peu

modifiés à l'échelle globale, contrairement aux profils de distribution de MBD2. Ces résultats suggèrent une implication de cette protéine MBP dans la régulation génique méthylation dépendante liée à la transformation oncogénique.

3.3.2 Rôle potentiel des MBP

Comme expliqué plus tôt dans l'introduction, la méthylation de l'ADN nécessite généralement d'être traduite par des protéines pour induire une répression transcriptionnelle. Durant ma thèse, j'ai obtenu quelques résultats préliminaires suggérant que la protéine MBD2 pourrait également réguler négativement la voie pro-apoptotique d'UNC5B (**Figure 51**). Ces résultats sont très préliminaires, mais semblent être également observés par d'autres dans des modèles cellulaires mammaires [341].

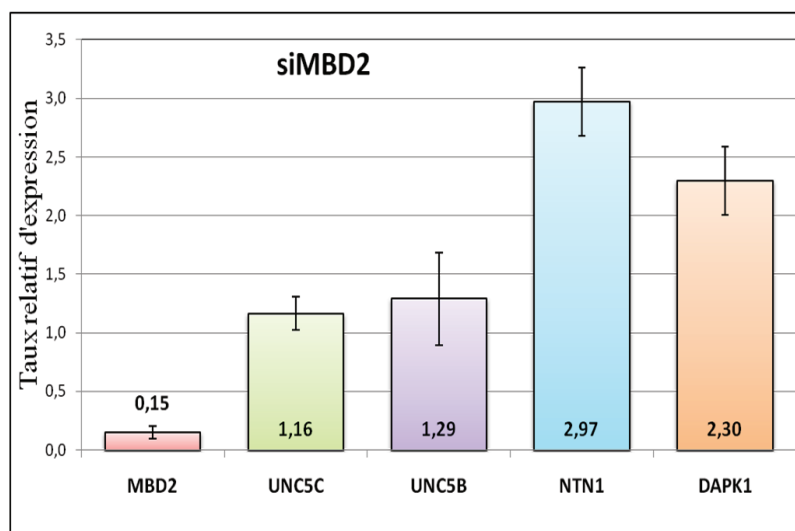


Figure 51 : Expression relative des gènes *MBD2*, *UNC5C*, *UNC5B*, *NTN1* et *DAPK1* dans les cellules HMLER traitées avec siRNA dirigé contre *MBD2*. L'expression de chacun des gènes a été comparée avec un siRNA témoin ne ciblant aucune séquence spécifique. Les différences observées sont significatives ($N \geq 3$, test de student, $p < 0,05$).

3.3.3 Rôle potentiel des modifications d'histones

La question suivante que l'on peut se poser est celle de l'intervention des modifications d'histones dans la régulation de la voie d'UNC5B.

Durant ma thèse, j'ai obtenu quelques résultats préliminaires suggérant que les traitements à l'aide de différentes doses d'inhibiteurs de HDAC (TSA, SAHA et panobinostat) permettent une réinduction légère, dans certaines conditions, de l'expression des gènes impliqués dans la voie pro-apoptotique d'UNC5B, et permettent une resensibilisation partielle des cellules aux anti-nétrine-1 (tests de viabilité cellulaire). Cette hypothèse est plausible puisque par exemple, UNC5B est montré hyperméthylé et posséderait des marques répressives d'histones dans les cancers gastriques [293]. Le rôle des modifications d'histones dans la perte de la voie pro-apoptotique des récepteurs à dépendance (RD), et plus particulièrement d'UNC5B nécessite d'être élucidé. A l'inverse, l'effet des inhibiteurs de HDAC sur la voie des RD peut également être testé ; même si ce dernier est probablement peu spécifique en termes de réinduction de l'expression génique (tout comme l'utilisation de décitabine), il se peut qu'il permette de réactiver notamment la voie pro-apoptotique des récepteurs à dépendance, et que par conséquent, son utilisation in vivo à de faibles doses suffise à resensibiliser les cellules tumorales aux anticorps ciblant l'interaction nétrine-1/UNC5B.

Comme on a pu le décrire dans l'introduction, il existe un jeu croisé entre différentes marques épigénétiques qui interviennent dans la régulation transcriptionnelle de gènes. Décrire l'ensemble de ces mécanismes et leurs conséquences sur la voie pro-apoptotique d'UNC5B, ou d'autres voies apoptotiques, permettrait de potentiellement anticiper d'avantage la survenue éventuelle de résistances et de rechutes dans les cancers.

3.3.3.1 Les récepteurs à dépendances et leur ligand : des cibles thérapeutiques ?

3.3.3.1.1 Hypothèse

Compte-tenu de leur fonctionnement bimodal, une stratégie thérapeutique basée sur la restauration de l'apoptose induite par les récepteurs à dépendance a été imaginée dans le cas de cancers associés à une surexpression de ligand(s). En effet, l'utilisation de composés capables d'interférer dans la liaison du ligand à son récepteur à dépendance devrait posséder un effet anti-tumoral, en déclenchant l'apoptose des cellules cancéreuses. Ces dernières années de nombreux travaux au laboratoire ont permis de vérifier le bienfondé d'une telle hypothèse et ont ainsi amorcé une recherche translationnelle importante au laboratoire [290, 288, 289, 336]. En effet, ces résultats ont ouvert le champ à la recherche de molécules thérapeutiques ciblant les ligands des récepteurs à dépendance, conduisant ainsi au dépôt de

plusieurs brevets et à la création d'une startup (Netris Pharma), plateforme de développement de molécules ciblant les ligands des récepteurs à dépendance dans les cancers

3.3.3.1.2 La stratégie en cours d'étude : un anticorps monoclonal anti-nétrine-1

Depuis presque 20ans, les anticorps monoclonaux thérapeutiques ont profondément modifié la prise en charge des cancers et leur apport dans l'arsenal thérapeutique est majeur. En plus d'être des molécules stables, capables d'interagir avec l'antigène cible, la portion Fc d'un anticorps thérapeutique a la capacité de se lier à des récepteurs Fc γ ou au complément ce qui lui permet d'activer (1) certaines cellules de l'immunité telles que les macrophages et les lymphocytes *natural killer* et (2) la voie classique du complément. Historiquement, les premiers anticorps monoclonaux développés ont été des anticorps murins, mais ils se sont révélés peu efficaces et fortement immunogènes. Les progrès considérables réalisés dans le domaine des biotechnologies ont permis le développement d'anticorps monoclonaux de plus en plus humains, c'est-à-dire chimériques, puis humanisés et enfin intégralement humains.

C'est dans ce contexte, qu'en partenariat Netris-Pharma, nous avons testé un anticorps monoclonal humain (net-1 mAb) *in vitro* et *in vivo* dans le modèle du sein présentés dans la partie « Résultats ». J'ai également effectué durant ma thèse un grand nombre de travaux avec cet anticorps sur le modèle des cancers du poumon non à petites cellules (données non montrées).

Cet anticorps, présente cependant des caractéristiques pharmacocinétiques (constante de dissociation (Kd) et volume de distribution) non conciliables avec un développement clinique. Ainsi, dans un souci constant d'avancer vers un débouché clinique de la stratégie thérapeutique ciblant l'interaction nétrine-1/récepteurs à dépendance, Netris-pharma a développé un nouvel anticorps humanisé présentant, cette fois-ci, des caractéristiques pharmacocinétiques, compatibles avec son développement clinique (NET-mAb), et avec lequel j'ai travaillé sur les deux modèles tumoraux sein et poumons.

3.3.3.2 Les récepteurs à dépendances en tant que cibles thérapeutiques : vers une application clinique ?

3.3.3.2.1 D'une preuve de concept à la clinique

Au cours de ces dernières années, ensemble de modèles *in vitro* et *in vivo* ont été étudiés pour leur réponse aux anti-nétrine-1 dans le laboratoire ainsi que chez Netris Pharma. Par exemple, des modèles cellulaires de xénogreffes (GRANTA-519, H358, A549, OCYL3) ont été testés pour leur réponse en termes de croissance tumorale (Cf manuscrit Cancer Cell, Figure 5D). De plus, un modèle de cancer colorectal associé à une inflammation chronique a été mis en place chez la souris, et fut suivi de traitements aux agents anti-nétrine-1. (Cf manuscrit Cancer Cell, Figure 5C). Dans ce modèle, il a été montré précédemment que la nétrine est surexprimée dans les tumeurs agressives [372]. Ainsi, le ciblage de l'interaction Nétrine-1/UNC5B par les traitements Net-1 mAb suffit à diminuer le taux de développement tumoral. De plus, une collaboration avec l'école vétérinaire de Lyon a été initiée par Marie Castets, en vue de tester l'efficacité du nouvel anticorps humanisé ciblant la nétrine-1 sur un modèle canin de lymphomes spontanés.

3.3.3.2.2 Détection de la nétrine-1 dans le sérum : un outil diagnostique?

De façon intéressante, une équipe a récemment observé une augmentation significative du taux de nétrine-1 plasmatique chez les patients atteints de cancers (du sein, du rein, de la prostate...) [373]. Les auteurs suggèrent que la détection plasmatique de nétrine-1 pourrait être un nouvel outil diagnostique pour la détection de ces cancers. Ceci permettrait également de déterminer facilement les patients éligibles ou non pour une thérapie interférant avec la nétrine-1. Le développement d'un test ELISA est actuellement en cours.

3.3.3.2.3 Vers la mise en place de thérapies combinées ?

3.3.3.2.3.1 Ciblage simultané de plusieurs couples récepteur à dépendance/ligand

Pour le moment, l'efficacité de la stratégie thérapeutique basée sur la restauration de l'apoptose induite par les récepteurs à dépendance n'a été testée que pour un seul couple ligand/récepteur à dépendance à la fois. Mais, nous l'avons vu précédemment, une même tumeur peut exprimer plusieurs couples ligand/récepteur à dépendance. Il serait donc intéressant de tester la pertinence d'une utilisation combinée de thérapies ciblant différents ligands des récepteurs à dépendance exprimés par une même tumeur.

3.3.3.2.3.2 Association anticorps monoclonaux anti-ligand et chimiothérapie « classique »

Ces dernières années, il est devenu de plus en plus courant de combiner les drogues utilisées en chimiothérapie avec l'utilisation d'anticorps monoclonaux (**Figure 52**). Ainsi dans le

traitement des cancers du poumon, on observe des traitements à l'Avastin, un anticorps monoclonal anti-VEGF qui sert d'anti-angiogénique, chez les patients dont le récepteur de l'EGF est muté. De la même manière, le trastuzumab est utilisé chez les patientes atteintes de cancers du sein exprimant l'oncogène HER2/Neu.

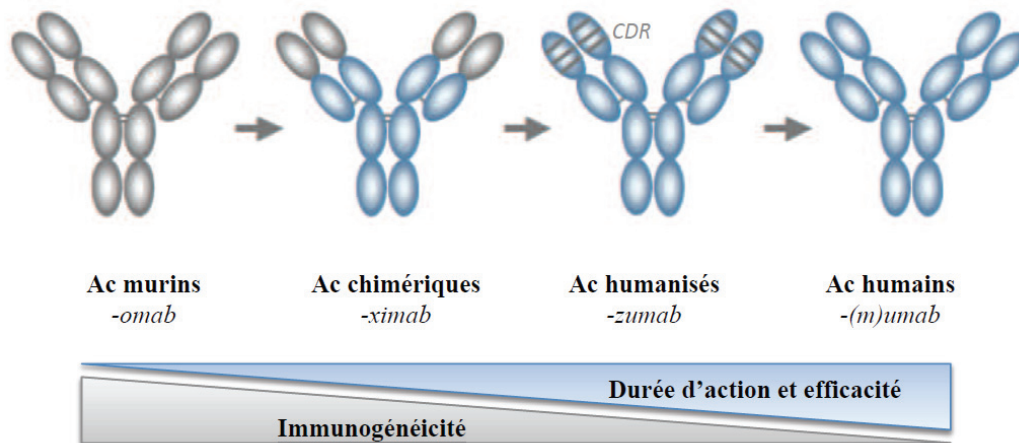


Figure 52 : Représentation schématique du développement des anticorps (Ac) monoclonaux thérapeutiques. Ces 20 dernières années, les progrès considérables réalisés dans le domaine des biotechnologies, ont permis le développement d'anticorps monoclonaux de plus en plus humains, diminuant ainsi leur immunogénéicité. La plupart du temps, cette humanisation permet également d'augmenter leur efficacité et leur stabilité, augmentant ainsi leur durée d'action.

Nous étudions donc actuellement au laboratoire la possibilité d'augmenter l'efficacité des molécules ciblant l'interaction ligand/récepteur à dépendance avec des drogues classiquement utilisées en chimiothérapie.

Ainsi, Andrea Paradisi, en association avec Netris Pharma, a récemment montré que le traitement à la Doxorubicine, agent intercalant de l'ADN fréquemment utilisé dans les protocoles de chimiothérapie, induit une augmentation de l'expression p53-dépendante de la nétrine-1 et de ses récepteurs, dans différentes lignées tumorales [286]. Les traitements à la Doxorubicine sont fréquemment associés à des phénomènes de résistance ; l'augmentation de l'expression de nétrine-1 et de ses récepteurs pourrait participer à ce phénomène en favorisant la survie des cellules. En ce sens, il a été montré *in vitro* et *in vivo*, dans des expériences de xénogreffes, que l'utilisation d'un agent interférant dans la liaison nétrine-1/récepteurs à dépendance, potentialise l'effet d'un traitement à la Doxorubicine [286].

Ces résultats suggèrent donc que la combinaison de chimiothérapies classiques avec une thérapie interférant dans la liaison nétrine-1/récepteurs à dépendance pourrait constituer une approche thérapeutique prometteuse. Ce mécanisme n'est vraisemblablement pas restreint à la Doxorubicine, puisque les traitements au 5-Fluorouracil, Paclitaxel et à la Cisplatine induisent également une augmentation de l'expression de nétrine-1 et de ses récepteurs à dépendance dans certaines lignées tumorales ; il conviendrait donc de tester leur potentielle synergie avec une stratégie nétrine-1-interférente *in vitro* et *in vivo*.

3.3.3.2.3.3 *Nétrine-1, récepteurs à dépendance et épigénétique*

De la même manière, j'ai étudié durant ma thèse les altérations de la voie de la nétrine-1 dans des cancers humains, et ai tenté de définir quelles sont les classes tumorales susceptibles de répondre au traitement simple avec l'anticorps, et quelles sont celles qui nécessitent l'utilisation d'un autre agent. En ayant déterminé le mécanisme impliqué dans la perte de sensibilité aux anticorps anti- nétrine-1 dans différents modèles *in vitro* et *in vivo*, mes travaux ont permis de comprendre un peu mieux les mécanismes de régulation de l'expression des gènes clés de la voie pro-apoptotique d'UNC5B, et par conséquent, d'effectuer potentiellement un meilleur ciblage des patients risquant de ne pas répondre aux NET-1 mAb. De plus, mes travaux ont permis d'augmenter les rangs des patients ciblés, puisqu'en étudiant les mécanismes de régulation transcriptionnelle de la voie pro-apoptotique d'UNC5B, en particulier la méthylation de l'ADN, j'ai montré dans un petit nombre de modèles précliniques le potentiel prometteur de cette approche.

3.3.3.2.4 Conclusions : des étapes cruciales avant l'entrée en phase clinique

Avant d'envisager l'entrée en phase clinique des composés développés par Netris Pharma, et notamment de l'anticorps humanisé ciblant la nétrine-1, plusieurs questions doivent être abordées :

L'efficacité de ce traitement sur des cas de cancers spontanés. *A ce propos, un modèle proposé dans le manuscrit soumis à Cancer Cell est celui de l'induction de tumeurs colorectales via le traitement AOM-DSS dans un modèle de souris. Le groupe de souris traitées à l'anticorps développent moins d'adénocarcinomes que le groupe de souris contrôle.*

L'innocuité du traitement dans un second temps ; en effet, les ligands des récepteurs à dépendance sont exprimés chez l'adulte, il convient donc d'éliminer d'éventuels effets

délétères « off-target ». De manière plus générale, les propriétés pharmacocinétiques, la génotoxicité, l'impact carcinogène/térogène et les effets sur la reproduction devront être évalués pour définir les effets indésirables liés aux thérapies candidates.

En ce sens, les propriétés pharmacocinétiques ont été évaluées et sont présentées dans le manuscrit que nous avons soumis à Cancer Cell. Elles sont accompagnées d'une étude de toxicologie faite chez le modèle de primate cynomolgus, et montrent une absence de signes cliniques évidents de toxicité chez les animaux. Ces résultats encourageants ont permis à Netris Pharma de mettre en place la première étude clinique de phase I pour cet anticorps, prévue pour début 2016 et qui devrait être effectuée sur différents types de cancers, en particulier les cancers du sein.

Les critères d'éligibilité des patients pour ce type de traitement ; il conviendra notamment de mieux cerner la voie de signalisation apoptotique en aval des récepteurs, afin d'exclure les patients présentant une inactivation de l'un des effecteurs de cette cascade de signalisation.

Ce propos concerne notamment mes travaux, puisque j'ai montré durant ma thèse que certaines tumeurs, si elles ne sont pas éligibles à des traitements à l'anticorps seul, peuvent l'être dans le cadre d'une thérapie combinée avec un inhibiteur de DNMT1, la décitabine. Ainsi, il semble donc désormais important de déterminer le point suivant :

La pertinence d'une utilisation combinée de thérapies (Chimiothérapies, traitements ciblant les modifications épigénétiques des gènes, ciblage d'autres ligands de récepteurs à dépendance surexprimés simultanément dans la même tumeur...).

L'objectif sous-jacent est de déterminer chez les patients sont les seuils d'altérations de cette voie qui rendent les patients éligibles à la mise en place d'une thérapie combinée. Dans le cas de l'hyperméthylation de *DAPK1* et de *NTN1*, cela implique de déterminer les taux d'expression et de méthylation de ces gènes sur les tumeurs. Ce type d'analyse peut être effectué à grande échelle, avec un séquençage haut débit des ARN ou la détermination du profil de méthylation des 450 000 CpG à l'aide de puces, ou à plus petite échelle par RTqPCR pour l'expression et Bisulfite/ PCR/ séquençage des échantillons.

Il est intéressant de noter que l'approche développée durant mes travaux de thèse fait l'objet actuellement d'une demande de brevet, et a été incluse dans la brochure d'investigation liée à la phase I clinique qui devrait être initiée au premier trimestre 2016.

4 CONCLUSIONS

Durant ma thèse, j'ai eu la chance d'aborder mon thème de recherche sous différents aspects ; tout d'abord j'ai étudié la voie des récepteurs à dépendance et ses altérations dans différents cancers. J'ai pu analyser les mécanismes cellulaires majeurs impliqués dans l'apoptose via UNC5B, et ainsi valider l'existence d'anomalies de cette voie dans les cancers du sein et du poumon non à petites cellules. En parallèle, je me suis attelée à la compréhension des mécanismes épigénétiques liés à la perte d'expression de DAPK1 et de NTN1 dans les tumeurs, plus particulièrement à la méthylation de l'ADN. Enfin, j'ai eu la chance de pouvoir tester différentes molécules intervenant dans l'ensemble de ces altérations, et ainsi démarrer des travaux précliniques sur des combinaisons thérapeutiques ciblées basées sur la réinduction d'une voie d'apoptose dans les cancers via l'utilisation d'épidrogues, et ses conséquences en termes de ciblage thérapeutique de cette voie. Mes travaux ont permis, je l'espère, de mieux comprendre comment les cellules tumorales altèrent la voie pro-apoptotique d'UNC5B, favorisant ainsi leur survie.

Ces travaux m'ont permis de prendre en main un large panel de techniques de biologie cellulaire, moléculaire, de bio-informatique, et d'expérimentation animale qui me seront utiles par la suite.

5 ANNEXES

5.1 Participation à d'autres travaux : Dynamique de la fixation de MBD2 sur les régions méthylées de l'ADN lors de la transformation maligne de cellules épithéliales mammaires humaines

5.1.1 Préambule

Comme mentionné dans la partie 2 de l'introduction, la méthylation de l'ADN est impliquée dans la répression transcriptionnelle via deux mécanismes principaux : le blocage de l'accès des facteurs de transcription à leur site au niveau de promoteurs de gènes, ainsi que le recrutement de répresseurs transcriptionnels ayant une forte affinité pour l'ADN méthylé, et dont la protéine MBD2 (Methyl DNA Binding Protein 2). Dans cette étude, nous avons montré que lors de la transformation cellulaire, la répartition globale des profils de méthylation n'était que peu modifiée, tandis que la répartition de MBD2 est profondément modifiée, et la redistribution de la protéine est retrouvée au niveau d'un grand nombre de promoteurs méthylés non exprimés. Ainsi, les gènes dont l'expression est diminuée durant la transformation oncogénique gagnent préférentiellement MBD2 au niveau de leur promoteur, et le corollaire inverse est également observé. Les gènes qui perdent la fixation de MBD sur leur promoteur voient leur expression augmentée.

Durant ma thèse, j'ai participé aux travaux réalisés principalement par Guillaume Devailly sur le rôle des changements de profils de fixation de la protéine MBD2 sur l'ADN méthylé dans un modèle de transformation oncogénique mammaire, le modèle HMEC => HMLER proposé par Weinberg [350], et reproduit au CRCL par l'équipe d'Alain Puisieux [351]. Ces travaux ont fait l'objet d'une publication dans le journal Nucleic Acid Research, à laquelle je participe en tant que second auteur.

J'ai participé pour ses travaux à culture cellulaire, traitements des cellules et la mise au point des techniques de précipitation de l'ADN méthylé, ainsi que les séquençages haut débit

permettant de déterminer les taux de méthylation avant/ après traitement décitabine pour une douzaine de gènes présentant des profils de liaison à MBD2 variables.

5.1.2 Publication

Dynamics of MBD2 deposition across methylated DNA regions during malignant transformation of human mammary epithelial cells.

Devailly Guillaume¹, Grandin Mélodie¹, Perriaud Laury², Mathot Pauline¹, Delcros Jean-Guy¹, Bidet Yannick³, Morel Anne-Pierre⁴, Bignon Jean-Yves³, Puisieux Alain⁴, Mehlen Patrick¹ and Dante Robert^{1*}

¹Dependence Receptors, Cancer and Development Laboratory - Equipe labellisée ‘La Ligue’, LabEx DEVweCAN, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon (CRCL), INSERM U1052-CNRS UMR5286, Université de Lyon, Centre Léon Bérard, 69008 Lyon, France

²Institut Curie, U612, Centre Universitaire, 91405, Orsay, France

³Laboratoire d'Oncologie Moléculaire, Centre Jean Perrin, 63011 Clermont-Ferrand, France

⁴EMT and cancer cell plasticity Laboratory - Equipe labellisée ‘La Ligue’, LabEx DEVweCAN, CRCL, INSERM U1052-CNRS UMR5286, Université de Lyon, Centre Léon Bérard, 69008 Lyon, France

*To whom correspondence should be addressed. Tel: +33 4 78 78 59 22; Fax: +33 4 78 78 27 20; Email: robert.dante@lyon.unicancer.fr

ABSTRACT

DNA methylation is thought to induce transcriptional silencing through the combination of two mechanisms: the repulsion of transcriptional activators unable to bind their target sites when methylated, and the recruitment of transcriptional repressors with specific affinity for methylated DNA. The Methyl CpG Binding Domain proteins MeCP2, MBD1 and MBD2 belong to the latter category. Here we present MBD2 ChIPseq data obtained from the endogenous MBD2 in an isogenic cellular model of oncogenic transformation of human mammary cells. In immortalized (HMEC-hTERT) or transformed (HMLER) cells, MBD2 was found in a large proportion of methylated regions and associated with transcriptional silencing. A redistribution of MBD2 on methylated DNA occurred during oncogenic transformation, frequently independently of local DNA methylation changes. Genes downregulated during HMEC-hTERT transformation preferentially gained MBD2 on their promoter. Furthermore, depletion of MBD2 induced an upregulation of MBD2-bound genes methylated at their promoter regions, in HMLER cells. Among the 3160 genes downregulated in transformed cells, 380 genes were methylated at their promoter regions in both cell lines, specifically associated by MBD2 in HMLER cells, and upregulated upon MBD2 depletion in HMLER. The transcriptional MBD2-dependent downregulation occurring during oncogenic transformation was also observed in two additional models of mammary cell transformation. Thus, the dynamics of MBD2 deposition across methylated DNA.

INTRODUCTION

In vertebrates, DNA methylation at transcriptional start sites (TSS) is an epigenetic modification associated with the downregulation of gene transcription (1). This epigenetic modification has been extensively studied during cell differentiation and neoplastic transformation, since DNA methylation changes are associated with these biological processes and may be involved in the control of gene expression (2–4). Although DNA methylation at specific sites can impair the direct binding of transcription factors to their targets and, in turn, may lead to transcriptional downregulation (5–8), these epigenetic signals are also interpreted by specific proteins (9). These proteins have been classified into three families (10–12) according to their methyl-DNA binding domain: the methyl-CpG binding domain (MBD) proteins; the UHRF proteins that bind methylated DNA through their SRA domain proteins; and a subclass of zinc finger binding proteins that preferentially bind methylated DNA sequences (ZBTB33, ZBTB4, ZBTB38, ZFP57, KLF4).

MeCP2, MBD1, MBD2, and MBD4 are members of the MBD protein family that recognize methylated CpG sites independently of their surrounding sequences *in vitro* (13). In human cells and *Xenopus* oocytes these proteins are found associated with chromatin remodeling complexes along with histone deacetylases and/or histone methylases (14–18). The ability of these proteins to recruit repressor complexes at methylated CpG sites has suggested a direct relationship between DNA methylation and the establishment of a repressive chromatin architecture. However, more recent findings suggesting that MBD proteins may also be involved in other mechanisms such as alternative splicing and gene activation (19–21) have tempered this concept.

Several genome maps of MBD2 deposition have been constructed from human and mouse cells. Analysis of MBD2 binding sites at 25,000 promoter regions indicates that the promoter regions targeted by the endogenous MBD2 proteins are methylated and depleted for RNA polymerase II (22). Furthermore, parallel sequencing of chromatin immunoprecipitated fragments (ChIPseq) obtained from human HeLa and MCF7 cells expressing tagged-MBD2 vectors has shown that MBD2 binding sites are methylated and that MBD2 deposition at TSS regions is associated with genes exhibiting repressive histone marks (21, 23). A linear relationship between DNA methylation and MBD2 deposition is observed in mouse ES cells and derived neuronal cells expressing biotin-tagged MBD2 proteins from a single copy transgene (24). Although these studies show that a small fraction of MBD2 binding sites at promoter regions may be unmethylated and correspond to actively transcribed genes, these genome-wide analyses indicate that the presence of MBD2 at TSS regions is predominantly associated with methylated genes exhibiting a low transcriptional activity. Altogether, this suggests that MBD2 acts mainly as a methylation-dependent transcriptional repressor.

As expected from a transcriptional repressor involved in epigenetic mechanisms, MBD2 seems to play a role in the acquisition of specific phenotypes. MBD2 can block full reprogramming of somatic to iPS cells through direct binding to *NANOG* promoter elements thereby preventing transcriptional activation (25). In mice, MBD2 deletion alters the immune response (26), protects mice from hind-limb ischemia (27), and greatly reduces the number of intestinal adenoma in tumor-prone *APC^{min}* mice (28, 29), mimicking the effects of experimentally induced DNA hypomethylation (30, 31). Detailed gene candidate analysis indicates that MBD2 controls the expression of some exocrine pancreatic genes in a tissue-specific manner in mice (32). For example, *TFF2* is expressed in duodenum and silenced in colon, while this gene is methylated in both tissues. This tissue-specific repression is correlated with the tissue-specific presence of MBD2 at *TFF2* promoter and MBD2 deletion leads to *TFF2* upregulation in colon (32), suggesting that the dynamics of MBD2 binding has a direct effect on gene transcription. Taken together these data suggest that the cell-specific transcriptional repression

occurring during differentiation or transformation may be associated, at least for some genes, with a redistribution of MBD2 proteins among methylated DNA regions.

In order to address this question we analyzed MBD2 binding sites in an isogenic cellular model of oncogenic transformation of human mammary epithelial cells constructed from the progression model described by Weinberg and colleagues (33). Human mammary cells were immortalized through the introduction of the human telomerase catalytic subunit gene (hTERT). The resulting immortalized cell line (HMEC-hTERT) was transformed by the introduction of the SV40 *T/t* antigens and oncogenic *H-RAS*^{V12} genes (HMLER cell line). In a similar model constructed from human fetal lung fibroblasts (MRC-5 cells), it has been shown that DNA methylation changes occur predominantly during hTERT-induced immortalization while only subtle changes are associated with the transformation by SV40 large *T*-antigen and *H-RAS*^{V12} (34). Thus, the comparison of HMEC-hTERT and HMLER cells offers the opportunity to investigate the potential modifications of MBD2 binding site associated with the acquisition of a specific phenotype in an isogenic background with a minor contribution of DNA methylation changes.

MATERIALS AND METHODS

Cell lines

HMEC-hTERT, HMLER, HME-ZEB1-RAS and mesenchymal HME-shP53-RAS cell lines were kindly provided by Anne-Pierre Morel (CRCL, Lyon, France) and cultured as previously described (35, 36).

Treatments

Cells were seeded at 1.10^5 per well in six-well plates. The day after plating, cells were either transfected with 100 pmol of MBD2 targeting siRNA (siMBD2; sens: 5'-GGAGGAAGUGAUCCGAAAdTdT-3') or control siRNA (siCtrl; Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, MISSION siRNA Universal Negative Controls #1) using Lipofectamine-2000 (Sigma-Aldrich) as specified by the manufacturer's instructions, or treated every day with 10 μ M of 5-aza-deoxycytidine (Sigma-Aldrich). Cells were collected 72 h after the start of the treatments.

Western-blot

Around 1.0×10^6 cells were lysed in NuPage LDS Sample Buffer and Reducing Agent (Life Technologies, Carlsbad, CA). Lysates were sonicated and heated at 95°C for 10 minutes. After migration and transfer, membranes were incubated with either anti-MBD2 (Santa Cruz, Heidelberg, Germany, sc-9397) or anti- β -Actin (Sigma-Aldrich, A5441) antibodies.

RNA extraction

Total RNA was extracted using the NucleoSpin RNA kit (Macherey-Nagel, Hoerd, France) following manufacturer's instructions. RNA purity, integrity and quantification were assessed using agarose gel-electrophoresis and analysis on a NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE). Pools of three to five independent extractions were sent for high throughput sequencing to MGX-Montpellier GenomiX (library preparation with the TruSeq RNA sample preparation Kit from Illumina, followed by single-end 50 bp sequencing on Illumina HiSeq 2000).

Digestion of genomic DNA

Genomic DNA was extracted from cell lines using the QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). Two hundred micrograms of DNA were digested overnight at 37°C with either HpaII or MspI restriction enzymes (New England BioLabs, Evry, France), and analyzed on ethidium bromide –containing agarose gels.

Methylated-DNA precipitation sequencing (MeDPseq)

Genomic DNA was sheared by sonication (final fragments ranged between 300-500 bp). Methylated-DNA precipitations (MeDP) were performed from 1 μ g of sheared DNA using the MethylMiner Methylated DNA Enrichment Kit (Life Technologies). Library preparation and high throughput sequencing (single-end 50 bp sequencing on Illumina HiSeq 2000) were performed at Beijing Genomics Institute (Hong-Kong, China) from pools of 5 independent experiments.

Chromatin Immunoprecipitation

MBD2 Chromatin Immunoprecipitations (ChIP) were performed as previously described (37). Briefly, sheared chromatin (with a mean fragment length between 300 and 500 bp) was obtained by sonication of formaldehyde cross-linked nuclei. ChIP were then performed with a custom-made rabbit polyclonal antiserum obtained after immunization with peptides corresponding to the N-terminal part

of the MBD2 protein (Covalab, Villeurbanne, Lyon) (38) using the ChIP Assay Kit (Merck Millipore, Saint-Quentin-en-Yvelines, France) as specified by the manufacturer's instruction. Precipitated DNA was finally purified using NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kit, (Macherey-Nagel) according to the manufacturer's protocol "DNA clean-up of samples containing SDS".

Input and bound fractions of DNA were dosed by fluorometry (Qubit 2.0, Life Technologies). Pools of 5 independent experiments were sent for high throughput sequencing to ProfileXpert (Lyon, France) (library preparation and single-end 50 bp sequencing on Illumina HiSeq 2000).

Alternatively, enrichment in the bound fraction as compared to the input was measured by qPCR for several regions, using iQ SYBR Green supermix (Biorad). Primer sequences and corresponding hybridization temperatures are listed in Table S1.

ChIP-chip and MeDP-chip

ChIP-chip and MeDP-chip experiments were performed as previously described (22). Briefly, chromatin fragments were precipitated with anti-MBD2 antibody (Covalab), and DNA fragments were precipitated using a His₆-tagged recombinant protein containing 4 MBD domains cloned from MBD1 (39). The DNA fragments from the ChIP and MeDP experiments were amplified by random PCR. The samples were then labeled with the GeneChip WT Double-Stranded DNA Terminal Labeling Kit and hybridized to the human tiling arrays (Human Promoter 1.0R Arrays), which were then washed and scanned by ProfileXpert service (Lyon, France) according to Affymetrix protocols. Microarray signals were analyzed using *aroma.affymetrix* package on the hg18 reference genome.

DNA methylation analysis

Bisulfite sequencing, used to determine the CpG methylation patterns of tens regions (Table S2), was performed as described in reference (40). Briefly, after a first amplification using sequence-specific primers, PCR fragments were tagged in a second amplification step and sequenced using the Roche/454 GS junior system according to the manufacturer's protocol (Roche emPCR Amplification Method Manual - Lib-A and Roche Sequencing Method Manual). The mean number of reads per sample was 475, see Table S2. Data were analyzed using *Amplifyzer* (<https://pypi.python.org/pypi/amplifyzer/0.97>).

RNAseq analysis

Reads were aligned on the UCSC *Homo sapiens* hg19 genome using TopHat2 (41). Differential expression analysis was performed as described in reference (42), using the Bioconductor package edgeR (43). Only genes with at least 1 read per million (RPM) in at least 2 of the samples were kept for subsequent analyses. Enriched Gene Ontology terms and KEGG pathway were identified using Gene Set Enrichment Analysis (44) with genes pre-ranked according to their fold change induced by siMBD2 treatment.

ChIPseq analysis

Reads were aligned on the UCSC *Homo sapiens* hg19 genome using Bowtie (45). Duplicate reads were filtered using SAMTools (46) to limit PCR induced biases. Preliminary peak detection was performed using MACS (47). Over sequenced regions were defined as 500 bp regions containing more than 3 times the median number of reads in at least 1 of the 2 inputs. Peaks were filtered against these over sequenced regions, as they represent suspicious false positive regions. Peaks in HMEC-hTERT and HMLER were compared using MANorm (48), and peaks common to both cell lines or cell line specific peaks (p value ≤ 0.01) were determined. Read density visualization at specific locations were

drawn with Sushi.R (49). K-mean clusterization of peaks and subsequent visualization were performed with seqMINER (50). Integrative analysis of ChIPseq, RNAseq, and ChIP-chip data was performed using the Bioconductor package Repitools (51). Top enriched motifs in peaks were obtained using the RSAT oligo-diff tool (52).

Data deposition

The ChIPseq, the RNAseq, and the microarray data from this publication have been submitted to the GEO database as entry GSE63237.

RESULTS

Identification of MBD2 binding sites and methylated DNA regions in HMEC-hTERT and HMLER cells.

To identify possible modifications of MBD2 deposition profiles associated with phenotype changes, genome-wide analyses (ChIPseq) were performed in an isogenic cellular model (Figure 1A) constructed from immortalized HMEC cells (HMEC-hTERT cells) transformed by expressing SV40 *T/t* antigen and *H-RAS*^{V12} (33, 35). In this study we focused on the endogenous protein in order to take into account the potential changes in the regulation of MBD2 during the transformation process. In parallel, we identified methylated DNA regions by MeDPseq experiments performed in both cell lines using the MethylMiner kit (Invitrogen) for selecting methylated DNA regions.

Methylated DNA regions and MBD2 peaks were identified from the aligned reads (sequenced fragments) (Figure 1B). These data were compared with ChIP-chip and MeDP-chip data obtained using an array representing 25,500 promoter regions (Human Promoter 1.0R array, Affymetrix). Methylated regions identified by MeDPseq were enriched in MeDP-chip experiments performed with recombinant proteins containing 4 MBD domains from MBD1 (22, 39) (Figure S1A and S1B). Similarly, MBD2 peaks identified from ChIPseq were enriched in MBD2 ChIP-chip (Figure S1C and S1D). Next, a group of genomic regions sharing the same characteristics (MBD2 binding and DNA methylation) in both cell lines was analyzed by ChIP-qPCR (Figure 2A). Data obtained indicated a good concordance between the two methods, qPCR (Figure 2A) and determination of the distribution of MBD2 reads by ChIPseq (Figure 2B-H). We also validated 14 cell-specific MBD2 binding sites (Figure S2). For many of these, DNA methylation changes did not seem to be associated with the gain of MBD2 binding sites in HMLER cells (Figure S2 regions 14q11.2, 12q11.22, 8q22.2, and 16p13.3). Ten of these regions were amplified by PCR from bisulfite-modified DNAs. Parallel sequencing of the PCR fragments validated their methylation status deduced from MeDP-seq experiments (Table S2). On all the regions analyzed by qPCR, we confirmed that depletion of MBD2 by siRNA strongly reduced ChIP efficiency (Figure S3), confirming the specificity of the antibody.

Endogenous MBD2 binding sites are methylated.

MBD2 binding sites (2.5 kb up and down of the center of each peak) were visualized by heat maps showing read density from the MBD2 ChIPseq (MBD2-reads), the MeDPseq (MeDP-reads), and the negative control, Input-seq. As expected, strong signal intensities were observed when MBD2-reads were plotted against MBD2 peaks (Figure 1C, HMLER cells and 1F, HMEC-hTERT cells). The centers of MBD2 peaks were also enriched in MeDP-reads (Figure 1C and 1F), indicating that high density in DNA methylation signals was associated with MBD2 binding sites. However, K means clustering showed that a subset of MBD2 peaks is associated with weakly or unmethylated DNA regions (Figure 1C and 1F). Conversely, DNA methylation peaks identified by MeDPseq were enriched in MeDP-reads (Figure 1D and 1G).

The clustering of MeDP positive regions according to their MBD2 ChIPseq read densities suggested that up to a quarter of methylated DNA regions were bound by endogenous MBD2 (Figure 1D and G). Altogether, these data indicated that, in HMEC-hTERT and HMLER cells, the endogenous MBD2 proteins associated predominantly methylated DNA regions, as previously reported from ectopic expression of tagged-MBD2 proteins in other cellular models (23, 24, 53). The relationship between DNA methylation and MBD2 binding was also observed at Alu sequences. Alu sequenced are classified into 3 main groups depending on the age of the sequence (RepeatMasker table download from UCSC). The younger sequences, AluY, were found to be more methylated than the AluJ (older

Alu sequences). The AluS, intermediate in age, exhibited an intermediate level of DNA methylation (Figure S4C). The distribution of MBD2 read densities on these Alu sequences was parallel to the DNA methylation profiles (Figure S4B).

When CpG islands (CGIs, UCSC database) were classified according to their length and plotted against MeDP-reads, the shorter CGIs tended to exhibit an increased read density (Figure 1E and 1H). These short CGIs were also enriched in MBD2 reads (Figure 1E and 1H), showing that MBD2 proteins targeted CpG-rich sequences when methylated. The clustering of CGIs according to their MBD2 ChIPseq or MeDPseq read densities led to the identification of a CGI subgroup where MBD2 binding or DNA methylation were detectable mainly on the shore of the islands, while another subgroup shown a preferential enrichment at the core sequences (Figure S5A and S5D).

Identification of enriched K-mer in MBD2 peaks using RSAT tool failed to identify any sequence specificity except the presence of CpG sites (Table S3). Altogether, these data indicated that DNA methylation is the main parameter driving MBD2 deposition.

MBD2 is a major DNA methylation-dependent transcriptional repressor.

Transcriptomes of HMEC-hTERT and HMLER cells were determined from RNAseq experiments. Genes with a methylated DNA region within +/- 1 kb of their TSS showed a low transcriptional level (Figure S5). Similarly, the transcriptional level of genes with MBD2 peaks within +/- 1 kb of their TSS was low (Figure S6). Thus MBD2 binding of promoter was linked to gene silencing.

The effects of MBD2 depletion and DNA methylation inhibition on gene transcription were then assessed. High throughput sequencing of poly-adenylated RNA (RNAseq) were performed with RNA extracted from HMLER cells treated with either siMBD2 (siRNA targeting *MBD2* transcripts (37, 54)) or 5-aza-deoxycytidine (DAC). Non-specific siRNA was used as a control. The analysis of the data was performed from duplicate RNAseq experiments (Table S4). RNAseq analysis indicated a reduction of 89.5 +/- 0.33% of MBD2 mRNA in siMBD2-treated HMLER cells, while the levels of MeCP2 and MBD1 transcripts were not affected (Table S4). This downregulation was also observed at protein level as shown by western blot analysis (Figure 3A). Digestion of genomic DNA with HpaII, a restriction enzyme inhibited by CpG methylation, indicated that 5-aza-deoxycytidine induced a global DNA hypomethylation of HMLER cells (Figure S7). Parallel sequencing of PCR fragments indicated that all the 9 methylated genes analyzed were hypomethylated after DAC treatments (TableS2). The classification of the sequenced molecules according to their methylation patterns indicated that this hypomethylation was not randomly distributed but corresponded to a mixture of fully demethylated molecules and unaffected molecules (data not shown).

Among the 14814 genes which expression level could be reliably assessed in our experiment (see materials and methods section), 14.6% (2164) were upregulated (fold change greater than 2, and p-value ≤ 0.01) upon siMBD2 treatments. In line with the previous experiments showing that MBD2 associated methylated DNA regions (Figure 1), a large proportion (~ 70%) of these upregulated genes were also found upregulated in HMLER cells treated with 5-aza-deoxycytidine (Figure 3B and 3D). Conversely, a subset of genes (~ 40%) upregulated in 5-aza-deoxycytidine-treated HMLER cells was also upregulated upon MBD2 depletion (Figure 3C and 3E).

Cross analyses of RNAseq, MBD2 ChIPseq and MeDPseq experiments were performed by plotting MBD2-read densities and MeDP-read densities at the TSS (+/- 3 kb) of genes classified in 7 clusters according to their responses to either MBD2 depletion or DNA methylation inhibition. These

data are summarized in Figure 3F-I and indicated that the upregulated genes upon MBD2 depletion were enriched in MBD2-reads near their TSS in untreated cells (Figure 3F, red curves). Therefore, MBD2 gene repressions were likely due to MBD2 binding at promoter regions. As expected from the correlation between MBD2 binding and DNA methylation, the TSS regions of these upregulated genes were also enriched in MeDP-reads. (Figure 3G, red curve). Conversely, the genes upregulated upon hypomethylation of HMLER cells were enriched in MBD2-reads and MeDP-reads (Figure 3H and 3I, red curves).

Enhancers are distal regulatory elements that can impact gene transcription levels. Andersson et al. (55) identified 66.942 enhancer-TSS association in the human genome. The clustering of these enhancers according to their MBD2 ChIPseq (Figure S8A) or MeDPseq read densities (Figure S8B) indicated that 6.412 and 10.896 enhancers were bound by MBD2 or methylated, respectively, in HMLER cells. Genes associated with MBD2 positive enhancers or methylated enhancers were significantly underexpressed (Figure S8C). A subset of these genes was unregulated upon treatments with siMBD2 (Figure S8D) or with 5-aza-deoxycytidine (Figure S8E).

Genes close to a CGI, exhibiting a methylated or a MBD2 positive core region, were expressed at a low level when compared with genes associated with unmethylated/MBD2-free CGI (Figure S5B and S5E). Furthermore, DAC and siMBD2 treatments led to an upregulation of the genes associated with methylated/MBD2-positive CGI-core regions (Figure S5C and F). Although significantly less affected, the transcription level of genes associated with methylated or MBD2-positive CGI-shore regions were also downregulated (Figure S5B and S5E), while inhibition of DNA methylation or MBD2 depletion upregulated these genes (Figure S5C and S5F). Thus, the repressive forces of DNA methylation and MBD2 binding seem to be positively correlated with CpG density.

A similar effect of MBD2 depletion or inhibition of DNA methylation was also observed at repeated elements. Depletion of MBD2 or 5-aza-deoxycytidine treatments induced a small increase of the steady state level of transcripts corresponding to AluY elements while the transcription level of the unmethylated and MBD2-free AluJ elements were unaffected by these treatments (Figure S4A).

These data highlighted the role of MBD2 in the DNA methylation-dependent gene repression and indicated that, for a large subset of genes, a loss of MBD2 or a demethylation have similar effects leading to their upregulation. Thus, we investigated the contribution of these two epigenetics events, MBD2 deposition and DNA methylation, on the downregulation associated with the transformation of immortalized HMEC-hTERT cells.

Dynamics of MBD2 deposition during oncogenic transformation.

Differential MBD2 binding profiles between HMEC-hTERT and HMLER cells were determined by quantitative comparison of MBD-peaks (48) identified by ChIPseq analyses. A high number (17899) of MBD2 peaks was not affected by the transformation process (Figure 4A). However, 5326 regions (22.9%) associated by MBD2 in HMEC-hTERT cells lost MBD2 in HMLER, while 7419 (29.3%) regions gained MBD2 binding in HMLER cells when compared with MBD2 profiles in HMEC-hTERT (Figure 4A). DNA methylation changes were more limited in proportion as HMEC-hTERT and HMLER cells shared 393631 DNA methylation peaks while 49995 regions (11.2%) were HMEC-hTERT specific and 65115 regions (14.1%) were HMLER specific (Figure 4B).

To investigate if MBD2 redistributions were due to local DNA methylation changes, we analyzed changes in MeDPseq read density at MBD2 peaks shared by both cell lines, or unique to either HMEC-hTERT or HMLER (Figure 4C). The mean values (number of HMLER MeDP-reads

minus HMEC-hTERT MeDP-reads) were near zero for all MBD2-peak categories. However, a few outliers did show a strong decrease of DNA methylation in regions losing MBD2, and a strong increase of DNA methylation in regions gaining MBD2. CHIP-qPCR experiments have exemplified this latter point at several chromosomal locations such as 10q11.22, 10p15.1 and 1p36.33 (Figure S2A).

Thus, at some methylated sites MBD2 deposition was not observed in HMEC-hTERT cells, while these sites were associated by MBD2 in HMLER cells. These data indicated that MBD2 deposition is a dynamic process not exclusively driven by DNA methylation changes.

MBD2 is involved in the repression of genes downregulated in oncogenic HMLER cells.

Interestingly, genes downregulated during the transformation of HMEC-hTERT gained MBD2-reads and MeDP-reads at TSS regions (Figure 4D and 4E, red curves). Furthermore, more than 50% (1168 out of 2164) of genes upregulated upon MBD2 depletion in HMLER cells were genes downregulated during the transformation process (Figure 4F and 4G). Read densities at the MBD2 peaks nearest to the annotated TSS of these 1168 genes were visualized by heat maps showing read density from the MBD2-reads and the MeDP-reads. At least half of these peak-regions were enriched in MBD2 in HMLER cells when compared with HMEC-hTERT cells (Figure 4H).

Data obtained for *TFPI2*, *LINC00842*, *OSR2*, *CLDN6* and *TNFRSF12A* genes illustrate this analysis (Figure 5E-I and Figure S9A). MBD2 deposition near the TSS of these genes was increased during oncogenic transformation (Figure S2 and Figure 5A-D). These genes were downregulated during oncogenic transformation. Depletion of MBD2 by siRNA led to an upregulation of these genes in the transformed cell line HMLER (Figure 5E-I). These data indicated that MBD2 participated in the establishment of transcriptomic changes induced by oncogenic transformation.

Dynamics of MBD2 deposition upon oncogenic transformation of immortalized human mammary cells by ZEB1 expression or P53 depletion.

Transcriptomic analyses of HMLER cells treated with siMBD2 or siControl indicated that MBD2 depletion led to an upregulation of genes that are silenced upon the transformation of HMEC-hTERT cells by expressing SV40 *T/t* antigens and *H-RAS*^{V12} genes. It has been shown that the expression of SV40-derived sequences affects several other pathways in addition to pRB and P53 (56), raising the possibility of a SV40-dependent redistribution of MBD2 proteins. Among the mechanisms able to cooperate with the expression of mutated *H-RAS* during neoplastic processes, the expression of the transcription factor *ZEB1* or the disruption of P53-pathways seem to play crucial roles (57, 58). Thus, the involvement of MBD2 in the control of gene expression was investigated in two cellular models (Figure 6A) in which SV40 *T/t*-antigens expression were replaced by *ZEB1* gene expression (HME-ZEB1-RAS cell line) or a shRNA targeting *P53* transcripts (HME-shP53-RAS cell line) (35, 36). When induced, both cell lines exhibited, as the HMLER cells, a mesenchymal phenotype and malignant properties (33, 35, 36).

We induced MBD2 depletion in HME-ZEB1-RAS and HME-shP53-RAS cells by siMBD2 treatments, and differential gene expression profiles between siMBD2 and siControl treated cells were determined from RNAseq experiments (Figure 6A). Transient transfection of siMBD2 resulted in a reduction of 89.0 +/-0.33% and 91.3 +/-0.25% of MBD2 transcripts in HME-ZEB1-RAS and HME-shP53-RAS cells respectively (Table S3), and a large decrease in MBD2 proteins was also observed from western blot analyses (Figure 5B).

We identified 584 genes upregulated by MBD2 depletion in at least two cell lines (Figure 5C, fold change ≥ 2 , p value ≤ 0.01). A large subset (247, 42.3%) of these genes were downregulated during oncogenic transformation (Figure 6D). According to our ChIPseq data, at least half of the MBD2 peaks near the TSS of these 247 genes shown an increase MBD2 binding in HMLER as compare to HMEC-hTERT (Figure S10). MBD2 ChIP-qPCR assays performed at genomic locations previously analyzed (Figure 2 and S2) indicated that MBD2 binding profiles identified in HMLER cells were frequently similar in HME-ZEB1-RAS and HME-shP53-RAS cells (Figure 7). Notably, various losses (17q25.3, 1q21.3) or gains (9q21.12, 10p15.1, 1p36.33, 8q22.2, 16p13.3) of MBD2 binding during oncogenic transformation were reproduced in these 2 models (Figure 7B, 5A-D and S9B). As expected from genome-wide data, parallel sequencing of PCR fragments obtained from bisulfite-modified DNA indicated that MBD2 deposition was correlated with DNA methylation in HME-ZEB1-RAS and HME-shP53-RAS cells at the ten genes analyzed (Table S2).

Altogether, these data suggest that MBD2 is involved in the regulation of gene expression during the transformation of HME-ZEB1-RAS and HME-shP53-RAS cells. This role is thus likely to be independent of the strategies involved in the abrogation of oncosuppressive barriers.

Genes repressed by MBD2 in transformed cell lines may contribute to the epithelial phenotype.

Genes upregulated by MBD2 depletion in HMLER, HME-ZEB1-RAS and HME-shP53-RAS were investigated for their Gene Ontology terms and their KEGG pathways contributions by Gene Set Enrichment Analysis (GSEA). Enriched Gene Ontology terms were of various natures but include EXTRACELLULAR_REGION, BASEMENT_MEMBRANE, INTEGRIN_COMPLEX (Supplementary Table S5). Enriched KEGG pathways included KEGG_CELL_ADHESION_MOLECULES_CAMS, KEGG_FOCAL_ADHESION (Table S4). Although genes repressed by MBD2 in the transformed cell lines showed a wide diversity of functions, some of them appeared to be associated with the epithelial phenotype. Their downregulation by MBD2 may contribute to the epithelio-mesenchymal transition induced by the oncogenic transformation of these cells.

DISCUSSION

It has long been known that DNA methylation patterns are altered in cancer cells (59, 60), these modifications include global loss of 5-methylcytosines and local hypermethylations (61, 62). Aberrant methylations at CpG islands have been extensively studied in past years since such hypermethylations have been found at the 5' regulatory sequences of many tumor suppressor genes and associated with their silencing (3, 63). Although the expression level of genes in their tissue of origin may influence their methylation status in the corresponding cancer cells (64), genome-wide studies have shown that hundreds of genes exhibiting hypermethylated CpG island at their 5' end were never methylated from embryonic development onwards (3).

From the first studies using *in vitro* methylated gene expression vectors, accumulating evidence indicates that the methylation of CpG rich sequences at the 5' end of a gene provides a strong signal for maintaining/inducing gene silencing (65, 66). In cell lines, inhibition of DNA methylation by cytosine analog (17) or DNMT1 knockdown (67, 68) leads to the re-expression of many methylated genes. This relationship has been also observed in living animals. For example, conditional inactivation of DNMT1 causes aberrant gene expression of many genes in mouse fibroblasts (69).

Histone deacetylation, histone methylation, and chromatin compaction are major events involved in gene repression and DNA methylation is associated with these chromatin modifications (70, 71). The importance of proteins associating DNA sequences was suggested many years ago by *in vitro* transcription assays showing that the methylation of templates does not prevent transcription (72), while methylated vectors are not transcribed in living cell (65, 73). From these pioneering works, it had been established that specific proteins from different families recognize methylated DNA. Among these proteins, the proteins containing a methyl-CpG binding domain were the first discovered (13, 74) and many studies have indicated that the MBD proteins are good candidates for interpreting the methylation signals (9, 10). In contrast with transcription factors, the sequence specificities of these proteins does not seem to be very stringent. *In vitro* assays indicate that MBD1 has a higher affinity for meCGCA or TGmeCGCA sites (75), while MeCP2 preferentially associates methylated CpG followed by a run of 4 or more A/T bases (76). However, the presence of symmetrically methylated CpGs seems to be the major determinant of their binding since multiple methylated CpGs can override their sequence preference at methylated sites (75, 76). Biochemical studies of MBD2 have also indicated a preference for a short sequence CmeCGA (77). In line with this finding, CCG sequences are preferentially found in many MBD2 genomic targets (77). However, this observation might be biased by over-representation of methylated CpG-rich sequences among the genomic targets of MBD2 (37, 78–82).

The intracellular concentrations of each MBD protein may also influence their targeting, for example in neurons MeCP2 is highly expressed and tracks methyl CpG densities (83). In HeLa cells, clearance of MBD2 by siRNA at the BRCA1-NBR2 locus does not promote the binding of the endogenous MeCP2 or MBD1 proteins. However, over-expression of a vector coding for MeCP2 induces its binding at this site (37). In mice, knockdown of the individual MBD proteins, MeCP2, MBD1, or MBD2 (84–86) results in the upregulation of many genes but not in global misexpression of endogenous methylated genes. Thus, other members of the family might compensate for the absence of a specific MBD since many cell and tissue types express multiple MBD proteins. Nevertheless, the deletion of a specific MBD protein leads to specific phenotypes (10), indicating a functional specificity for these proteins and gene candidate analysis has provided examples of gene specific upregulation.

Altogether, these data argue against a full redundancy between MeCP2, MBD1 and MBD2, and suggest that the distribution of MBD proteins across the methylated regions might represent an additional level in the interpretation of the DNA methylation marks. Indeed, our analysis of the MBD2 binding profiles during the oncogenic transformation of immortalized human mammary cells indicates that the modifications of MBD2 distribution are, for a subset of genes, independent of DNA methylations changes.

Although chromatin immuno-precipitation of endogenous MBD proteins has proven challenging (23, 24, 53), we have performed ChIPseq against endogenous MBD2 proteins in two isogenic cell lines in order to take into account the cell-specific regulation of MBD2. Despite the significant differences in technologies, ChIPseq data correlated well with those obtained from MBD2 ChIP-chip experiments. ChIP-qPCR on arbitrary chosen negative or positive regions also showed a good concordance between data obtained from ChIP-qPCR and ChIPseq experiments. Furthermore, MBD2 depletion upon siRNA treatments strongly reduced MBD2 ChIP efficiency on these regions. Thus, the data obtained from ChIPseq experiments performed from antibodies directed against the endogenous proteins seem to be representative of the MBD2 binding profiles of the studied cell lines.

The identification of MBD2 binding sites has provided an opportunity for the search of *in vivo* sequence preferences driving MBD2 deposition. In line with previous biochemical analyses, we did not detect any over-represented sequences in the MBD2 peaks, CG sequence excepted. Nevertheless, the proposed preference for a CCG sequence (77) may escape this analysis since this short sequence is over-represented in CpG islands.

The lack of consensus sequence and the strong enrichment in methylated CpGs at MBD2 peaks support a direct relationship between DNA methylation and MBD2 binding, at least in HMEC-hTERT and HMLER cells. The method used for the mapping of methylated DNA regions was based on the selection of methylated DNA fragments using recombinant proteins associating methylated CpGs. Thus, selected fragments can contain additional CpGs that were not methylated, preventing a direct evaluation of the methylated-CpG density. Nevertheless, combining the mapping of MBD2-tagged proteins with single-base-pair resolution methylomes allow the establishment of a linear relationship between MBD2 enrichment and methylation density, in neuronal cells (24). It should be noted that, for a minority of MBD2 binding sites, additional events participate in MBD2 deposition. Indeed, we observed that some MBD2 peaks were not associated with methylated DNA regions. In line with this observation, it has been proposed that the NuRD complex mediates the binding of MBD2 to unmethylated DNA regions (24). Altogether, these data indicate that the main determinant for MBD2 binding is the methylation status of the DNA in both HMEC-hTERT and HMLER cells. Furthermore, about 25% of the methylated DNA regions identified from MeDPseq matched MBD2 binding sites. Although we cannot exclude that other methyl DNA binding proteins associated the same methylated DNA regions (82), MBD2 seems to be an important player in the epigenetic machinery in HMEC-hTERT and HMLER cells.

MBD2 knockdown experiments were also in favor of an involvement of MBD2 in the downregulation of many methylated genes. Depletion of MBD2 by siRNA induced an upregulation of about 2000 genes and 70% of these genes were also upregulated by a 5-aza-deoxycytidine treatments in HMLER cells. The analysis of TSS regions of genes upregulated upon MBD2 depletion in untreated HMLER cells indicated that these genes were enriched in MBD2 and DNA methylation marks when compared with genes unaffected or downregulated by MBD2 siRNA. Conversely, the TSS regions of genes upregulated by 5-aza-deoxycytidine were enriched in MBD2 when compared with unaffected or downregulated genes upon DNA hypomethylation. The impact of MBD2 depletion on gene expression

was globally less stringent than 5-aza-deoxycytidine treatments. DNA hypomethylation induced the upregulation of a higher number of genes than MBD2 depletion and higher fold changes in gene expression. It is tempting to explain these differences by the involvement of other MBD proteins and of MBP proteins from other families in the repression of methylated genes. However, the distinct nature of both treatments prevents a quantitative comparison, since data may be biased by differences in treatment efficiencies and kinetics. Further analysis of our data at non promoter regions indicated that DNA methylation at enhancer sequences was correlated with low transcriptional activity of the genes potentially regulated by these elements, as previously reported in embryonic stem cell (87). Furthermore, a correlation between MBD2 deposition at enhancer sequences and low transcriptional activity was also observed, suggesting that MBD2 may modulate the activity of regulatory regions not directly associated with the 5' end gene regions. These data also confirm that MBD2 plays an important role in the interpretation of DNA methylation signal in HMLER cells.

In the isogenic cellular model studied, the immortalized cells (HMECT-hTERT) and the oncogenic cells HMLER, most of the MBD2 binding sites were shared by both cell lines. However, oncogenic transformation was associated with a partial redistribution of MBD2 proteins, 5326 MBD2-positive regions in HMEC-hTERT lost MBD2 binding in HMLER, while 7419 regions in HMEC-hTERT gained MBD2 in HMLER cells. Such redistribution may be in part explained by local DNA methylation changes. Nevertheless, the majority of the regions gaining or losing MBD2 in HMLER exhibited comparable MeDPseq-read densities in both cell lines. This redistribution of MBD2 was also observed at promoter regions and associated with the modulation of the transcriptional activity of the corresponding genes. Among the 3160 genes downregulated in transformed cells, 380 genes were methylated at their promoter regions in both cell lines, specifically associated by MBD2 in HMLER cells, and upregulated upon MBD2 depletion in HMLER. Thus, the redistribution of MBD2 proteins occurring in HMLER cells seemed, at least for a subset of genes, independent of DNA methylation changes. As observed for MeCP2 (76), not all the potential MBD2 binding sites were precipitated by MBD2 antibodies suggesting that additional factors are involved in MBD2 deposition. Several hypotheses, not mutually exclusive, could explain these specific profiles, competition with transcription factors (26), steric hindrance due to chromatin proteins, stabilization of the interaction between MBD2 and methylated DNA by other proteins.... Although the precise mechanisms driving the specificity of the MBD family protein profiles remain to be experimentally established, redistribution of MBD2 proteins across methylated DNA regions seems to be associated with the transformation process(es) occurring in the immortalized human mammary cell lines cells expressing the SV40 *T/t* antigens and *H-RAS*^{V12}, or either *ZEB1* or a shP53.

HMLER cells were obtained by sequential introduction of hTERT, SV40 large *T*/small *t* antigens, oncogenic *H-RAS*^{V12} genes (33, 35) in primary cultures of human mammary epithelial cells. The expression of SV40 sequences affects multiple pathways in human mammary cells (56), raising questions about a SV40-dependent redistribution of MBD2 proteins. We also suppressed the oncosuppressive barriers in HMEC-hTERT cells either by ectopic expression of the transcription factor *ZEB1* or a *P53* depletion. The resulting HMLER cell lines, after introduction of *H-RAS*^{V12} gene, exhibited oncogenic properties and a mesenchymal phenotype (36). In HME-ZEB1-RAS and HME-shP53-RAS, most of the 14 regions exhibiting a gain or loss of MBD2 in HMLER cells showed similar MBD2 binding changes. Furthermore, hundreds of genes upregulated by MBD2 depletion in HME-ZEB1-RAS and HME-shP53-RAS cells were also upregulated in HMLER upon treatment with the siRNA targeting *MBD2*. Thus, the dynamics of MBD2 deposition do seem to be independent of the strategy used for overcoming the oncosuppressive barriers. However, we cannot exclude that a large

part of the MBD2 redistributions observed are linked to the introduction of *H-RAS*^{V12}. MBD2 redistribution and its consequences on gene expression have been investigated in experimental models. Nevertheless, it should be noted that ZEB1 reactivation is a common feature of aggressive and undifferentiated human breast cancers, especially in the claudin-low intrinsic subtype (88), and that alterations of P53-pathways play a crucial role in human cancers (89).

The involvement of MBD2 in the oncogenic process has been already suggested. For example, MBD2 repression of *Lect2* gene may participate in polyp formations via Wnt signaling pathways in mice carrying *Apc*^{Min} alleles (29). In human mammary cancer cell lines, the repression of *DAPK1* mediated by MBD2 seems to actively participate in maintenance of their aggressive phenotypes when xenografted into immuno-deficient mice (90). None of these genes was targeted by MBD2 during transformation in the cellular models studied here (Table S4). The role of MBD2 in transformation is likely to be due to the repression of multiple targets, which may differ between experimental models or pathologies. Nevertheless, the genes downregulated during the oncogenic transformation of immortalized human mammary cells seem to be preferential targets for MBD2. Furthermore, these genes were preferentially reactivated by MBD2 depletion and enriched in MBD2 binding sites in cell lines constructed from the disruption of oncosuppressive barriers in immortalized cells. It has been reported that in similar cellular models, the major methylation changes at gene promoters occur during the immortalization step, while subsequent steps of oncogenic transformation are associated with subtle modifications of DNA methylation and gene expression (34). In line with these data, we only find minor modifications of the DNA methylation patterns between the immortalized cells, HMEC-hTERT, and the oncogenic HMLER cells. Altogether, these data emphasize, at genome-wide level, the role played by the epigenetics readers of DNA methylation during oncogenic transformation. The reprogramming of cancer cells may be due to a redistribution of methyl-DNA binding proteins in addition to DNA methylation alterations.

REFERENCES

1. Deaton, A. and Bird, A. (2011) CpG islands and the regulation of transcription. *Genes Dev.*, 10.1101/gad.2037511.1010.
2. Esteller, M. (2008) Epigenetics in cancer. *N. Engl. J. Med.*, **358**, 1148–59.
3. Baylin, S.B. and Jones, P. a (2011) A decade of exploring the cancer epigenome - biological and translational implications. *Nat. Rev. Cancer*, **11**, 726–34.
4. Ehrlich, M. and Lacey, M. (2013) DNA methylation and differentiation: silencing, upregulation and modulation of gene expression. *Epigenomics*, **5**, 553–68.
5. Iguchi-Ariga, S.M. and Schaffner, W. (1989) CpG methylation of the cAMP-responsive enhancer/promoter sequence TGACGTCA abolishes specific factor binding as well as transcriptional activation. *Genes Dev.*, **3**, 612–619.
6. Kim, J. (2003) Methylation-sensitive binding of transcription factor YY1 to an insulator sequence within the paternally expressed imprinted gene, Peg3. *Hum. Mol. Genet.*, **12**, 233–245.
7. Campanero, M.R., Armstrong, M.I. and Flemington, E.K. (2000) CpG methylation as a mechanism for the regulation of E2F activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **97**, 6481–6.
8. Watt, F. and Molloy, P.L. (1988) Cytosine methylation prevents binding to DNA of a HeLa cell transcription factor required for optimal expression of the adenovirus major late promoter. *Genes Dev.*, **2**, 1136–1143.
9. Bird, A. (2002) DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.*, **16**, 6–21.
10. Defossez, P.-A. and Stancheva, I. (2011) Biological functions of methyl-CpG-binding proteins. 1st ed. Elsevier Inc.
11. Baubec, T. and Schübeler, D. (2014) Genomic patterns and context specific interpretation of DNA methylation. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **25**, 85–92.
12. Sasai, N. and Defossez, P.-A. (2009) Many paths to one goal? The proteins that recognize methylated DNA in eukaryotes. *Int. J. Dev. Biol.*, **53**, 323–34.
13. Hendrich, B. and Bird, A. (1998) Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins. *Mol. Cell. Biol.*, **18**, 6538–47.
14. Nan, X., Ng, H.H., Johnson, C.A., Laherty, C.D., Turner, B.M., Eisenman, R.N. and Bird, A. (1998) Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature*, **393**, 386–9.
15. Fujita, N., Watanabe, S., Ichimura, T., Tsuruzoe, S., Shinkai, Y., Tachibana, M., Chiba, T. and Nakao, M. (2003) Methyl-CpG binding domain 1 (MBD1) interacts with the

- Suv39h1-HP1 heterochromatic complex for DNA methylation-based transcriptional repression. *J. Biol. Chem.*, **278**, 24132–8.
16. Sarraf, S.A. and Stancheva, I. (2004) Methyl-CpG binding protein MBD1 couples histone H3 methylation at lysine 9 by SETDB1 to DNA replication and chromatin assembly. *Mol. Cell*, **15**, 595–605.
 17. Jones, P.L., Veenstra, G.J., Wade, P.A., Vermaak, D., Kass, S.U., Landsberger, N., Strouboulis, J. and Wolffe, A.P. (1998) Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat. Genet.*, **19**, 187–91.
 18. Ng, H.H., Zhang, Y., Hendrich, B., Johnson, C.A., Turner, B.M., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Reinberg, D. and Bird, A. (1999) MBD2 is a transcriptional repressor belonging to the MeCP1 histone deacetylase complex. *Nat. Genet.*, **23**, 58–61.
 19. Wischnewski, F., Friese, O., Pantel, K. and Schwarzenbach, H. (2007) Methyl-CpG binding domain proteins and their involvement in the regulation of the MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, and MAGE-A12 gene promoters. *Mol. Cancer Res.*, **5**, 749–59.
 20. Yasui, D.H., Peddada, S., Bieda, M.C., Vallero, R.O., Hogart, A., Nagarajan, R.P., Thatcher, K.N., Farnham, P.J. and Lasalle, J.M. (2007) Integrated epigenomic analyses of neuronal MeCP2 reveal a role for long-range interaction with active genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **104**, 19416–21.
 21. Dhasarathy, A. and Wade, P. a (2008) The MBD protein family-reading an epigenetic mark? *Mutat. Res.*, **647**, 39–43.
 22. Chatagnon, A., Perriaud, L., Nazaret, N., Croze, S., Benhattar, J., Lachuer, J. and Dante, R. (2011) Preferential binding of the methyl-CpG binding domain protein 2 at methylated transcriptional start site regions. *Epigenetics*, **6**, 1295–307.
 23. Günther, K., Rust, M., Leers, J., Boettger, T., Scharfe, M., Jarek, M., Bartkuhn, M. and Renkawitz, R. (2013) Differential roles for MBD2 and MBD3 at methylated CpG islands, active promoters and binding to exon sequences. *Nucleic Acids Res.*, **41**, 3010–3021.
 24. Baubec, T., Ivánek, R., Lienert, F. and Schübeler, D. (2013) Methylation-dependent and -independent genomic targeting principles of the mbd protein family. *Cell*, **153**, 480–492.
 25. Lee, M.R., Prasain, N., Chae, H.-D., Kim, Y.-J., Mantel, C., Yoder, M.C. and Broxmeyer, H.E. (2013) Epigenetic regulation of NANOG by miR-302 cluster-MBD2 completes induced pluripotent stem cell reprogramming. *Stem Cells*, **31**, 666–81.
 26. Hutchins, A.S., Mullen, A.C., Lee, H.W., Sykes, K.J., High, F. a, Hendrich, B.D., Bird, A.P. and Reiner, S.L. (2002) Gene silencing quantitatively controls the function of a developmental trans-activator. *Mol. Cell*, **10**, 81–91.

27. Rao, X., Zhong, J., Zhang, S., Zhang, Y., Yu, Q., Yang, P., Wang, M.-H.H., Fulton, D.J., Shi, H., Dong, Z., et al. (2011) Loss of methyl-CpG-binding domain protein 2 enhances endothelial angiogenesis and protects mice against hind-limb ischemic injury. *Circulation*, **123**, 2964–74.
28. Sansom, O.J., Berger, J., Bishop, S.M., Hendrich, B., Bird, A. and Clarke, A.R. (2003) Deficiency of Mbd2 suppresses intestinal tumorigenesis. *Nat. Genet.*, **34**, 145–7.
29. Pesse, T.J., Parry, L., Reed, K.R., Ewan, K.B., Dale, T.C., Sansom, O.J. and Clarke, A.R. (2008) Deficiency of Mbd2 attenuates Wnt signaling. *Mol. Cell. Biol.*, **28**, 6094–103.
30. Laird, P.W., Jackson-Grusby, L., Fazeli, A., Dickinson, S.L., Jung, W.E., Li, E., Weinberg, R.A. and Jaenisch, R. (1995) Suppression of intestinal neoplasia by DNA hypomethylation. *Cell*, **81**, 197–205.
31. Eads, C.A., Nickel, A.E. and Laird, P.W. (2002) Complete genetic suppression of polyp formation and reduction of CpG-island hypermethylation in Apc(Min/+) Dnmt1-hypomorphic Mice. *Cancer Res.*, **62**, 1296–9.
32. Berger, J., Sansom, O., Clarke, A. and Bird, A. (2007) MBD2 is required for correct spatial gene expression in the gut. *Mol. Cell. Biol.*, **27**, 4049–57.
33. Elenbaas, B., Spirio, L., Koerner, F., Fleming, M.D., Zimonjic, D.B., Donaher, J.L., Popescu, N.C., Hahn, W.C. and Weinberg, R.A. (2001) Human breast cancer cells generated by oncogenic transformation of primary mammary epithelial cells. *Genes Dev.*, **15**, 50–65.
34. Gordon, K., Clouaire, T., Bao, X.X., Kemp, S.E., Xenophontos, M., de Las Heras, J.I. and Stancheva, I. (2014) Immortality, but not oncogenic transformation, of primary human cells leads to epigenetic reprogramming of DNA methylation and gene expression. *Nucleic Acids Res.*, **42**, 3529–41.
35. Morel, A.-P., Lièvre, M., Thomas, C., Hinkal, G., Ansieau, S. and Puisieux, A. (2008) Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition. *PLoS One*, **3**, e2888.
36. Morel, A.-P., Hinkal, G.W., Thomas, C., Fauvet, F., Courtois-Cox, S., Wierinckx, A., Devouassoux-Shisheboran, M., Treilleux, I., Tissier, A., Gras, B., et al. (2012) EMT inducers catalyze malignant transformation of mammary epithelial cells and drive tumorigenesis towards claudin-low tumors in transgenic mice. *PLoS Genet.*, **8**, e1002723.
37. Auriol, E., Billard, L.-M., Magdinier, F. and Dante, R. (2005) Specific binding of the methyl binding domain protein 2 at the BRCA1-NBR2 locus. *Nucleic Acids Res.*, **33**, 4243–54.

38. Perriaud, L., Lachuer, J. and Dante, R. (2013) The ‘Methyl-CpG Binding Domain Protein 2’ plays a repressive role in relation to the promoter CpG content in the Normal Human Cell Line MRC5. *Curr. Pharm. Des.*, **5**, 1–6.
39. Jørgensen, H.F., Adie, K., Chaubert, P. and Bird, A.P. (2006) Engineering a high-affinity methyl-CpG-binding protein. *Nucleic Acids Res.*, **34**, e96.
40. Beygo, J., Citro, V., Sparago, A., De Crescenzo, A., Cerrato, F., Heitmann, M., Rademacher, K., Guala, A., Enklaar, T., Anichini, C., et al. (2013) The molecular function and clinical phenotype of partial deletions of the IGF2/H19 imprinting control region depends on the spatial arrangement of the remaining CTCF-binding sites. *Hum. Mol. Genet.*, **22**, 544–57.
41. Kim, D., Pertea, G., Trapnell, C., Pimentel, H., Kelley, R. and Salzberg, S.L. (2013) TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biol.*, **14**, R36.
42. Anders, S., McCarthy, D., Chen, Y., Okoniewski, M., Smyth, G., Huber, W. and Robinson, M. (2013) Count-based differential expression analysis of RNA sequencing data using R and Bioconductor. *Nat. Protoc.*, **8**, 1765–1786.
43. Robinson, M.D., McCarthy, D.J. and Smyth, G.K. (2010) edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*, **26**, 139–40.
44. Subramanian, A., Tamayo, P., Mootha, V.K., Mukherjee, S., Ebert, B.L., Gillette, M.A., Paulovich, A., Pomeroy, S.L., Golub, T.R., Lander, E.S., et al. (2005) Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **102**, 15545–50.
45. Langmead, B., Trapnell, C., Pop, M. and Salzberg, S.L. (2009) Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol.*, **10**, R25.
46. Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G. and Durbin, R. (2009) The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*, **25**, 2078–9.
47. Zhang, Y., Liu, T., Meyer, C. a, Eeckhoute, J., Johnson, D.S., Bernstein, B.E., Nusbaum, C., Myers, R.M., Brown, M., Li, W., et al. (2008) Model-based analysis of ChIP-Seq (MACS). *Genome Biol.*, **9**, R137.
48. Shao, Z., Zhang, Y., Yuan, G.-C., Orkin, S.H. and Waxman, D.J. (2012) MAnorm: a robust model for quantitative comparison of ChIP-Seq data sets. *Genome Biol.*, **13**, R16.

49. Phanstiel, D.H., Boyle, A.P., Araya, C.L. and Snyder, M.P. (2014) Sushi.R: flexible, quantitative and integrative genomic visualizations for publication-quality multi-panel figures. *Bioinformatics*, 10.1093/bioinformatics/btu379.
50. Ye, T., Krebs, A.R., Choukrallah, M.-A., Keime, C., Plewniak, F., Davidson, I. and Tora, L. (2011) seqMINER: an integrated ChIP-seq data interpretation platform. *Nucleic Acids Res.*, **39**, e35.
51. Statham, A.L., Strbenac, D., Coolen, M.W., Stirzaker, C., Clark, S.J. and Robinson, M.D. (2010) Repitools: An R package for the analysis of enrichment-based epigenomic data. *Bioinformatics*, **26**, 1662–1663.
52. Thomas-Chollier, M., Defrance, M., Medina-Rivera, A., Sand, O., Herrmann, C., Thieffry, D. and van Helden, J. (2011) RSAT 2011: regulatory sequence analysis tools. *Nucleic Acids Res.*, **39**, W86–91.
53. Menafra, R., Brinkman, A.B., Matarese, F., Franci, G., Bartels, S.J.J., Nguyen, L., Shimbo, T., Wade, P.A., Hubner, N.C. and Stunnenberg, H.G. (2014) Genome-wide binding of MBD2 reveals strong preference for highly methylated loci. *PLoS One*, **9**, e99603.
54. Chatagnon, A., Bougel, S., Perriaud, L., Lachuer, J., Benhattar, J. and Dante, R. (2009) Specific association between the methyl-CpG-binding domain protein 2 and the hypermethylated region of the human telomerase reverse transcriptase promoter in cancer cells. *Carcinogenesis*, **30**, 28–34.
55. Andersson, R., Gebhard, C., Miguel-Escalada, I., Hoof, I., Bornholdt, J., Boyd, M., Chen, Y., Zhao, X., Schmidl, C., Suzuki, T., et al. (2014) An atlas of active enhancers across human cell types and tissues. *Nature*, **507**, 455–61.
56. Hahn, W.C., Dessain, S.K., Brooks, M.W., King, J.E., Elenbaas, B., Sabatini, D.M., DeCaprio, J.A. and Weinberg, R.A. (2002) Enumeration of the simian virus 40 early region elements necessary for human cell transformation. *Mol. Cell. Biol.*, **22**, 2111–23.
57. Chaffer, C.L., Marjanovic, N.D., Lee, T., Bell, G., Kleer, C.G., Reinhardt, F., D'Alessio, A.C., Young, R.A. and Weinberg, R.A. (2013) Poised chromatin at the ZEB1 promoter enables breast cancer cell plasticity and enhances tumorigenicity. *Cell*, **154**, 61–74.
58. Puisieux, A., Brabletz, T. and Caramel, J. (2014) Oncogenic roles of EMT-inducing transcription factors. *Nat. Cell Biol.*, **16**, 488–94.
59. Feinberg, A.P. and Vogelstein, B. (1983) Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature*, **301**, 89–92.

60. Gama-Sosa, M.A., Slagel, V.A., Trewyn, R.W., Oxenhandler, R., Kuo, K.C., Gehrke, C.W. and Ehrlich, M. (1983) The 5-methylcytosine content of DNA from human tumors. *Nucleic Acids Res.*, **11**, 6883–94.
61. Baylin, S.B., Herman, J.G., Graff, J.R., Vertino, P.M. and Issa, J.P. (1998) Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia. *Adv. Cancer Res.*, **72**, 141–96.
62. Ehrlich, M. (2002) DNA methylation in cancer: too much, but also too little. *Oncogene*, **21**, 5400–13.
63. Kulis, M. and Esteller, M. (2010) DNA methylation and cancer. *Adv. Genet.*, **70**, 27–56.
64. Sproul, D., Kitchen, R.R., Nestor, C.E., Dixon, J.M., Sims, A.H., Harrison, D.J., Ramsahoye, B.H. and Meehan, R.R. (2012) Tissue of origin determines cancer-associated CpG island promoter hypermethylation patterns. *Genome Biol.*, **13**, R84.
65. Vardimon, L., Kressmann, A., Cedar, H., Maechler, M. and Doerfler, W. (1982) Expression of a cloned adenovirus gene is inhibited by in vitro methylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **79**, 1073–7.
66. Molloy, P.L. (1986) Effects of DNA methylation on specific transcription by RNA polymerase II in vitro. *Mol. Biol. Rep.*, **11**, 13–17.
67. Zhang, Q., Wang, H.Y., Marzec, M., Raghunath, P.N., Nagasawa, T. and Wasik, M.A. (2005) STAT3- and DNA methyltransferase 1-mediated epigenetic silencing of SHP-1 tyrosine phosphatase tumor suppressor gene in malignant T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **102**, 6948–53.
68. Wozniak, R.J., Klimecki, W.T., Lau, S.S., Feinstein, Y. and Futscher, B.W. (2007) 5-Aza-2'-deoxycytidine-mediated reductions in G9A histone methyltransferase and histone H3 K9 di-methylation levels are linked to tumor suppressor gene reactivation. *Oncogene*, **26**, 77–90.
69. Jackson-Grusby, L., Beard, C., Possemato, R., Tudor, M., Fambrough, D., Csankovszki, G., Dausman, J., Lee, P., Wilson, C., Lander, E., et al. (2001) Loss of genomic methylation causes p53-dependent apoptosis and epigenetic deregulation. *Nat. Genet.*, **27**, 31–9.
70. Lee, T.I. and Young, R.A. (2013) Transcriptional regulation and its misregulation in disease. *Cell*, **152**, 1237–51.
71. Apostolou, E. and Hochedlinger, K. (2013) Chromatin dynamics during cellular reprogramming. *Nature*, **502**, 462–71.
72. Jove, R., Sperber, D.E. and Manley, J.L. (1984) Transcription of methylated eukaryotic viral genes in a soluble in vitro system. *Nucleic Acids Res.*, **12**, 4715–30.

73. Stein, R., Razin, A. and Cedar, H. (1982) In vitro methylation of the hamster adenine phosphoribosyltransferase gene inhibits its expression in mouse L cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **79**, 3418–22.
74. Meehan, R.R., Lewis, J.D., McKay, S., Kleiner, E.L. and Bird, A.P. (1989) Identification of a mammalian protein that binds specifically to DNA containing methylated CpGs. *Cell*, **58**, 499–507.
75. Clouaire, T., de las Heras, J.I., Merusi, C. and Stancheva, I. (2010) Recruitment of MBD1 to target genes requires sequence-specific interaction of the MBD domain with methylated DNA. *Nucleic Acids Res.*, **38**, 4620–34.
76. Klose, R.J., Sarraf, S. a., Schmiedeberg, L., McDermott, S.M., Stancheva, I. and Bird, A.P. (2005) DNA binding selectivity of MeCP2 due to a requirement for A/T sequences adjacent to methyl-CpG. *Mol. Cell*, **19**, 667–678.
77. Scarsdale, J.N., Webb, H.D., Ginder, G.D. and Williams, D.C. (2011) Solution structure and dynamic analysis of chicken MBD2 methyl binding domain bound to a target-methylated DNA sequence. *Nucleic Acids Res.*, **39**, 6741–6752.
78. Magdinier, F. and Wolffe, A.P. (2001) Selective association of the methyl-CpG binding protein MBD2 with the silent p14/p16 locus in human neoplasia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **98**, 4990–5.
79. Singal, R., van Wert, J. and Bashambu, M. (2001) Cytosine methylation represses glutathione S-transferase P1 (GSTP1) gene expression in human prostate cancer cells. *Cancer Res.*, **61**, 4820–6.
80. Bakker, J., Lin, X. and Nelson, W.G. (2002) Methyl-CpG binding domain protein 2 represses transcription from hypermethylated pi-class glutathione S-transferase gene promoters in hepatocellular carcinoma cells. *J. Biol. Chem.*, **277**, 22573–80.
81. Lin, X. and Nelson, W.G. (2003) Methyl-CpG-binding domain protein-2 mediates transcriptional repression associated with hypermethylated GSTP1 CpG islands in MCF-7 breast cancer cells. *Cancer Res.*, **63**, 498–504.
82. Lopez-Serra, L., Ballestar, E., Fraga, M.F., Alaminos, M., Setien, F. and Esteller, M. (2006) A profile of methyl-CpG binding domain protein occupancy of hypermethylated promoter CpG islands of tumor suppressor genes in human cancer. *Cancer Res.*, **66**, 8342–6.
83. Skene, P.J., Illingworth, R.S., Webb, S., Kerr, A.R.W., James, K.D., Turner, D.J., Andrews, R. and Bird, A.P. (2010) Neuronal MeCP2 is expressed at near histone-octamer levels and globally alters the chromatin state. *Mol. Cell*, **37**, 457–68.

84. Chen, R.Z., Akbarian, S., Tudor, M. and Jaenisch, R. (2001) Deficiency of methyl-CpG binding protein-2 in CNS neurons results in a Rett-like phenotype in mice. *Nat. Genet.*, **27**, 327–31.
85. Guy, J., Hendrich, B., Holmes, M., Martin, J.E. and Bird, A. (2001) A mouse *Mecp2*-null mutation causes neurological symptoms that mimic Rett syndrome. *Nat. Genet.*, **27**, 322–6.
86. Hendrich, B., Guy, J., Ramsahoye, B., Wilson, V.A. and Bird, A. (2001) Closely related proteins MBD2 and MBD3 play distinctive but interacting roles in mouse development. *Genes Dev.*, **15**, 710–23.
87. Xie, W., Schultz, M.D., Lister, R., Hou, Z., Rajagopal, N., Ray, P., Whitaker, J.W., Tian, S., Hawkins, R.D., Leung, D., et al. (2013) Epigenomic analysis of multilineage differentiation of human embryonic stem cells. *Cell*, **153**, 1134–48.
88. Prat, A., Parker, J.S., Karginova, O., Fan, C., Livasy, C., Herschkowitz, J.I., He, X. and Perou, C.M. (2010) Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res.*, **12**, R68.
89. Vogelstein, B. and Kinzler, K.W. (2004) Cancer genes and the pathways they control. *Nat. Med.*, **10**, 789–99.
90. Mian, O.Y., Wang, S.Z., Zhu, S.Z., Gnanapragasam, M.N., Graham, L., Bear, H.D. and Ginder, G.D. (2011) Methyl-binding domain protein 2-dependent proliferation and survival of breast cancer cells. *Mol. Cancer Res.*, **9**, 1152–62.

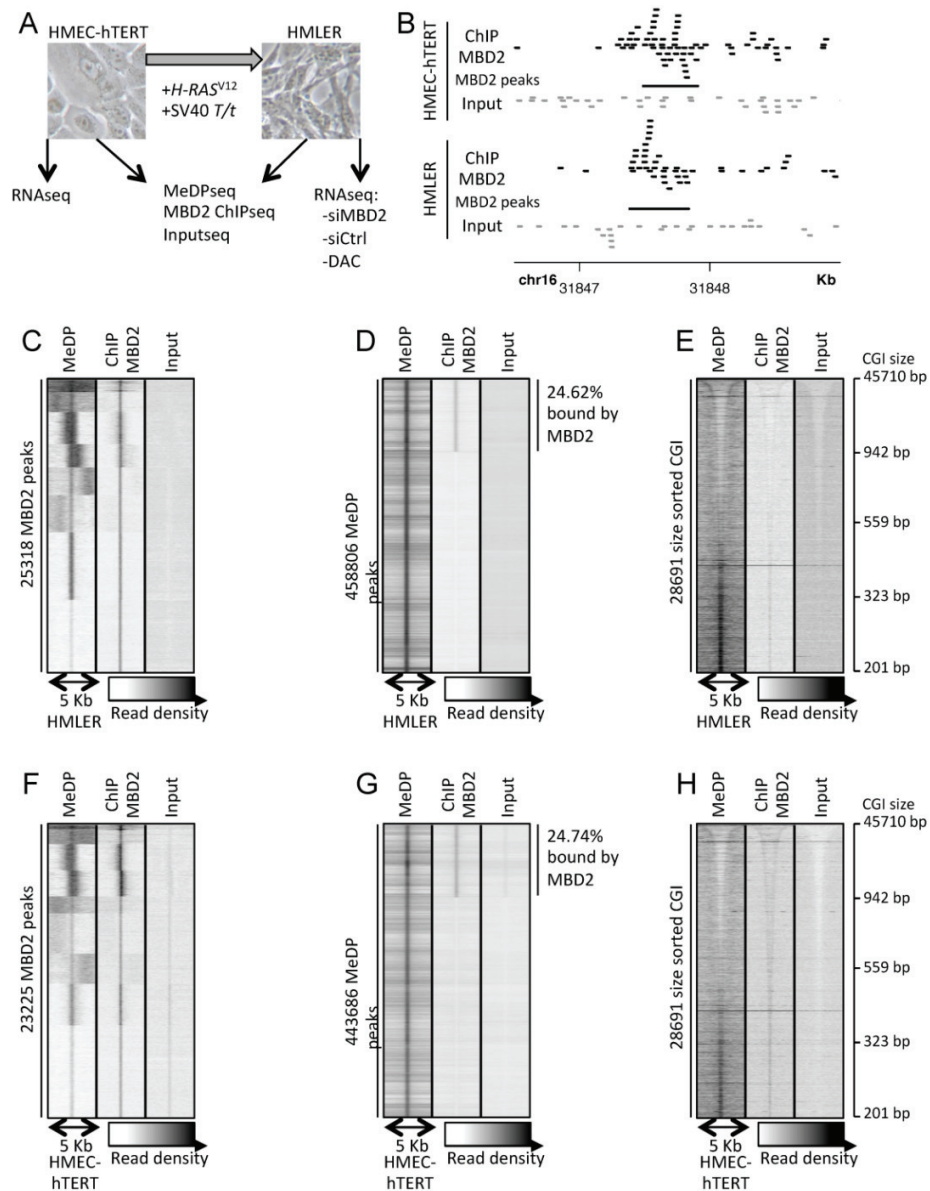


Fig 1 Devailly et al.

Figure 1. Endogenous MBD2 proteins bind methylated DNA regions. (A) Experimental scheme; the transformed mesenchymal HMLER cell line is derived from the immortalized epithelial HMEC-hTERT cells by oncogenic transformation using *H-RAS*^{V12} and SV40 *T/t* oncogenes. Sequencings were performed on a pool of 5 independent experiments. (B) Reads visualization at a MBD2 peak present in each cell line; MBD2 reads in black, input reads in gray, MBD2 peaks in black bars. Reads matching the + and - strands are on top and bottom, respectively. (C and F) Read density of MeDPseq, MBD2 ChIPseq and Input at each MBD2 peak. (D and G) Read density of MeDPseq, MBD2 ChIPseq and input at each MeDP peak. (E and H) Read density of MeDPseq, MBD2 ChIPseq and input at each CpG island (CGI), sorted by their size. (C to E) HMLER cell line. (F to H) HMEC-hTERT cell line.

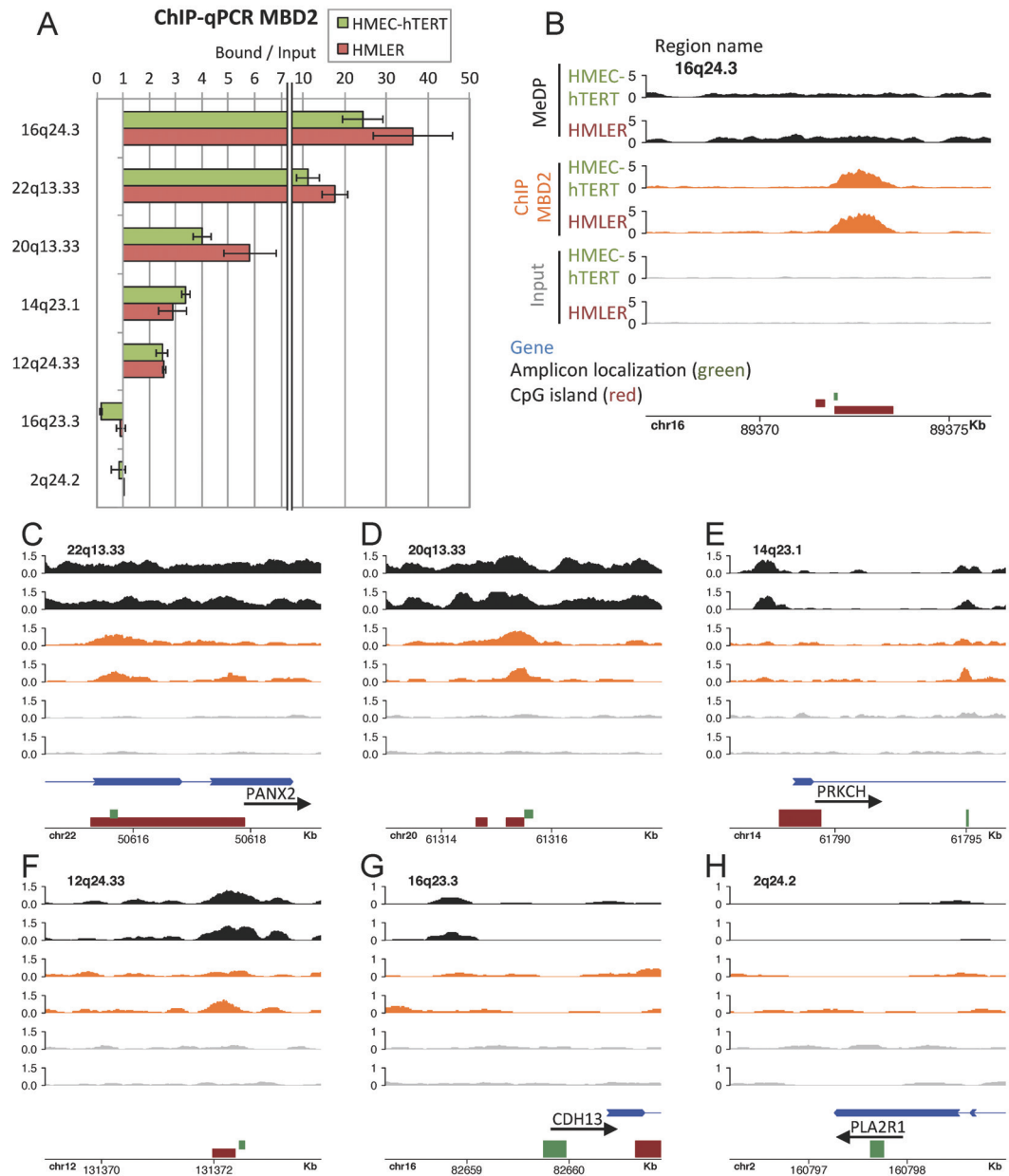


Fig 2 Devailly et al.

Figure 2. Concordance between ChIP-qPCR and ChIP-MBD2 at various genomic locations. (A) ChIP-qPCR experiments mapping MBD2 binding sites, in HMEC-hTERT cells (green) and HMLER cells (red). Each experiment was performed in duplicate. (B-H) Genome coverage for MeDP-seq (black), ChIP-MBD2-seq (orange) and Input-seq (gray) in HMEC-hTERT (upper tracks) and HMLER (bottom tracks) at the 7 genomic location tested in A. Scales are in Fragments Per Million (FPM); Genes in blue, CpG islands in red; qPCR amplicon localization in green.

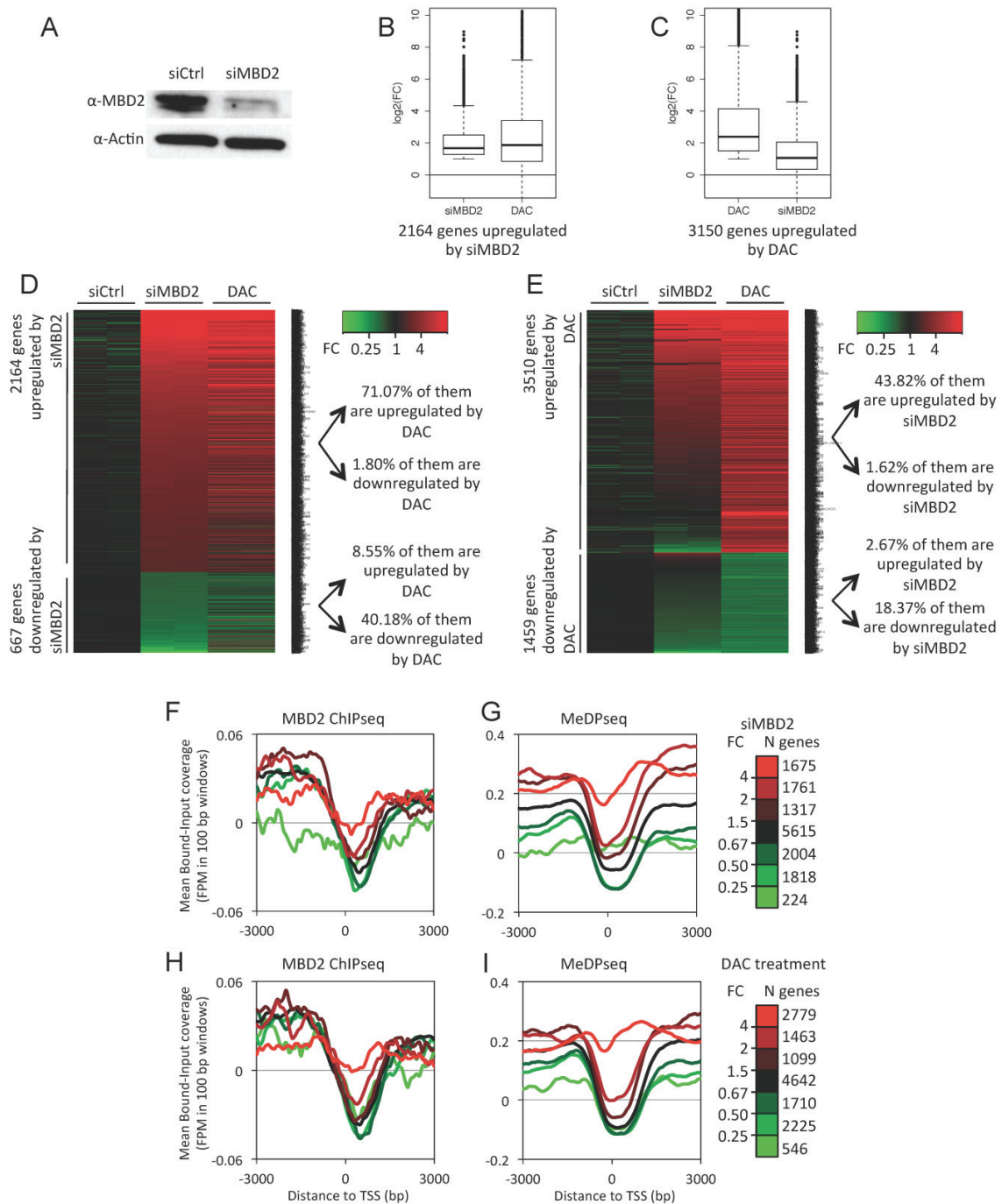


Fig 3 Devailly et al.

Figure 3. MBD2 is a methylation-dependent transcriptional repressor in HMLER cells. (A) Immunoblot analysis of MBD2 proteins in siRNA treated HMLER cells. (B) Box plots depicting the fold changes (FC) of the transcription levels of genes upregulated upon MBD2 depletion (siMBD2) and the FC of the same genes in 5-aza-deoxycytidine treated cells

(DAC). The upregulated genes were defined as genes exhibiting a $FC \geq 2$ with a p value ≤ 0.01 . (C) Box plots depicting the FC of the transcription levels of genes upregulated upon DAC treatments and the FC of the same genes in MBD2-depleted HMLER cells. (D) Heat maps of genes upregulated or downregulated upon siRNA targeting MBD2. Most of the genes upregulated by MBD2 depletion were also upregulated by DAC treatments. (E) Heat maps of genes upregulated or downregulated upon DAC treatments. About 44% of the genes upregulated upon DAC treatments were also upregulated by MBD2 depletion. (F to I) Integrative analysis of ChIPseq and RNAseq. Mean coverages at gene promoters were plotted according to their responses to MBD2 siRNA or DAC treatments. Genes were classified into 7 groups according to their responses to either MBD2 depletion or DNA methylation inhibition. N genes: number of genes in each group. For each gene cluster, mean MBD2-read densities and mean MeDP-read densities at the TSS (± 3 kb) were determined. (F) MBD2-read density at TSS regions of genes classified by their response to siMBD2. (G) MeDP-read density at TSS regions of genes classified by their response to siMBD2. (H) MBD2-read density at TSS regions of genes classified by their response to DAC treatments. (I) MeDP-read density at TSS regions of genes classified by their response to DAC treatments.

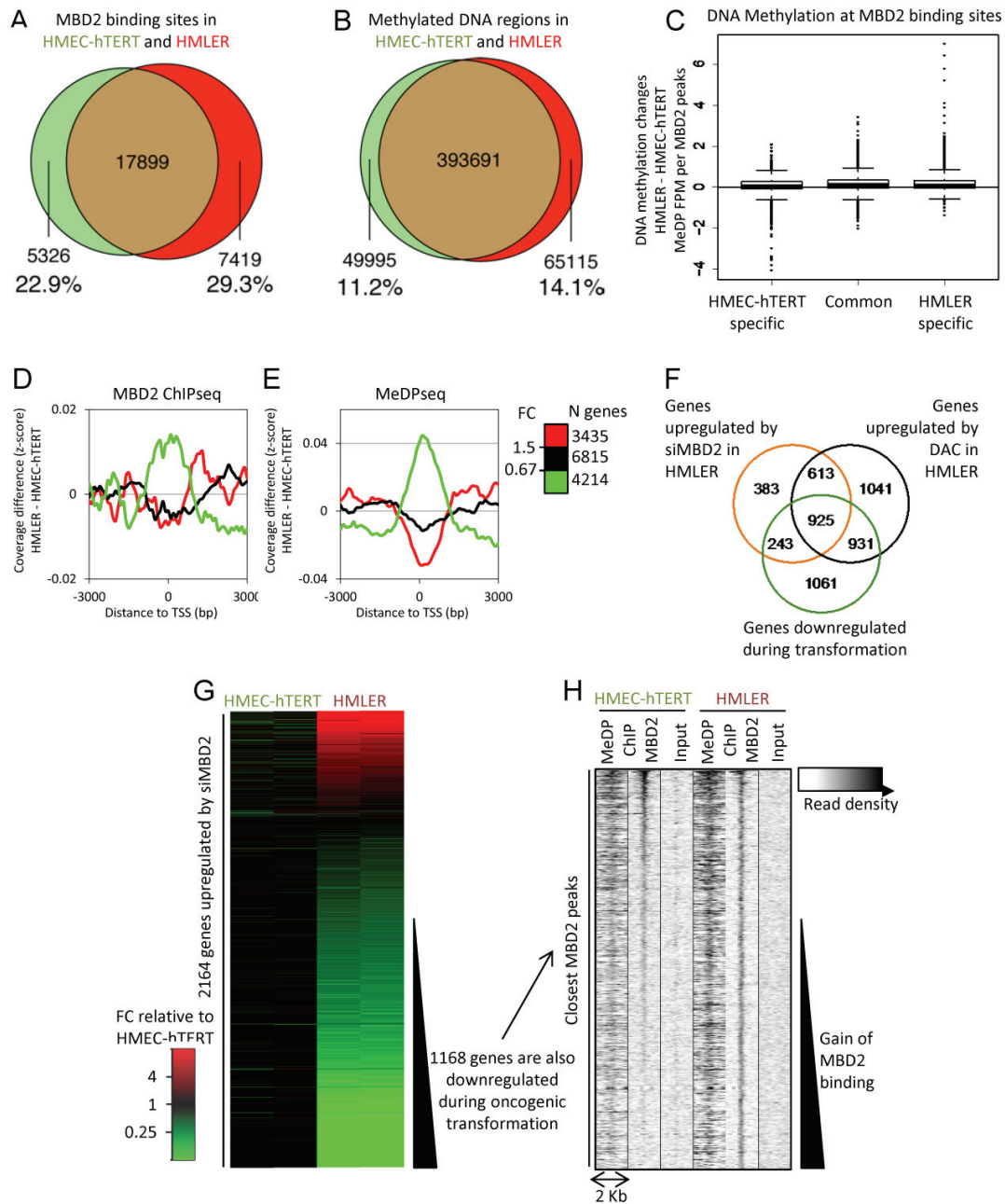


Fig 4 Devailly et al.

Figure 4. Dynamics of MBD2 distribution during oncogenic transformation. (A) Venn diagram depicting the overlap between MBD2 binding sites of HMEC-HTERT and HMLER cells; in green: regions that significantly lose MBD2 during transformation (p value ≤ 0.01), in red: regions that significantly gain MBD2 during transformation (p value ≤ 0.01), in brown: common regions. (B) Venn diagram depicting the overlap between methylated DNA regions of HMEC-HTERT and HMLER cells; in green: regions that significantly lose DNA

methylation during transformation (p value ≤ 0.01), in red: regions that significantly gain DNA methylation during transformation (p value ≤ 0.01), in brown: common methylated DNA regions. (C) DNA methylation changes at MBD2 binding sites. Differences in MeDP coverage (FPM, Fragments Per Million) at MBD2 peaks were computed for regions bound by MBD2 in both cell lines, losing MBD2 or gaining MBD2 in HMLER when compared with HMEC-hTERT. (D and E) Genes were classified according to their differential expression level (FC) between HMEC-hTERT and HMLER cells. (D) Genes downregulated during oncogenic transformation gain MBD2-reads near their TSS (red curve), in contrast to unaffected (black curve) or downregulated genes (green curve). (E) Genes downregulated during oncogenic transformation exhibited gain of MeDP-reads near their TSS (red curve), in contrast to unaffected (black curve) or downregulated genes (green curve) (F) Venn diagram depicting the overlap between genes upregulated upon MBD2 depletion, DAC treatments and genes downregulated in HMLER cells when compared with HMEC-hTERT cells. A large proportion of genes downregulated during oncogenic transformation was also upregulated upon MBD2 depletion and DNA methylation inhibition in the transformed HMLER cell line. (G) Transcription level modification between HMEC-hTERT and HMLER, of the 2164 genes upregulated after a siMBD2 treatment in HMLER. 1168 of these genes are expressed at least 2 times less in HMLER than in HMEC-hTERT. (H) Read densities from MeDPseq, MBD2 ChIPseq and Input-seq in HMEC-hTERT and HMLER, at the closest MBD2 peaks in HMLER cells from the TSS of the 1168 genes identified in (G). Around half of these regions shown an increase MBD2 ChIPseq read density in HMLER as compared to HMEC-hTERT.

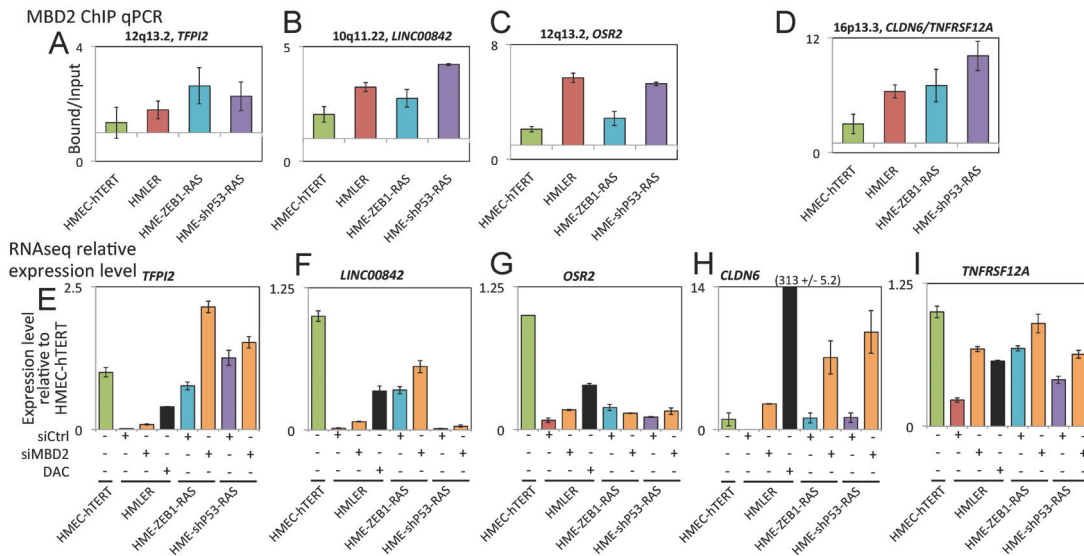


Fig 5 Devailly et al.

Figure 5. Examples of genes repressed by MBD2 during oncogenic transformation. (A-D) MBD2 ChIP-qPCR at 4 genomic regions corresponding to 5 gene promoters in the HMEC-hTERT cell line and the transformed HMLER, HME-ZEB1-RAS and HME-shP53-RAS cell lines. These regions exhibited an increase of MBD2 binding during oncogenic transformation. Each experiment was performed 2 times independently. (E-I) Relative expression of 5 genes in HMEC-hTERT, HMLER treated with a control siRNA (siCtrl), a siRNA targeting *MBD2* (siMBD2) or 5-aza-deoxycytidine (DAC), HME-ZEB1-RAS treated with a control siRNA or a siRNA targeting *MBD2*, and in HME-shP53-RAS treated with a control siRNA or a siRNA targeting *MBD2*. Expression levels were estimated from RNA sequencing duplicates.

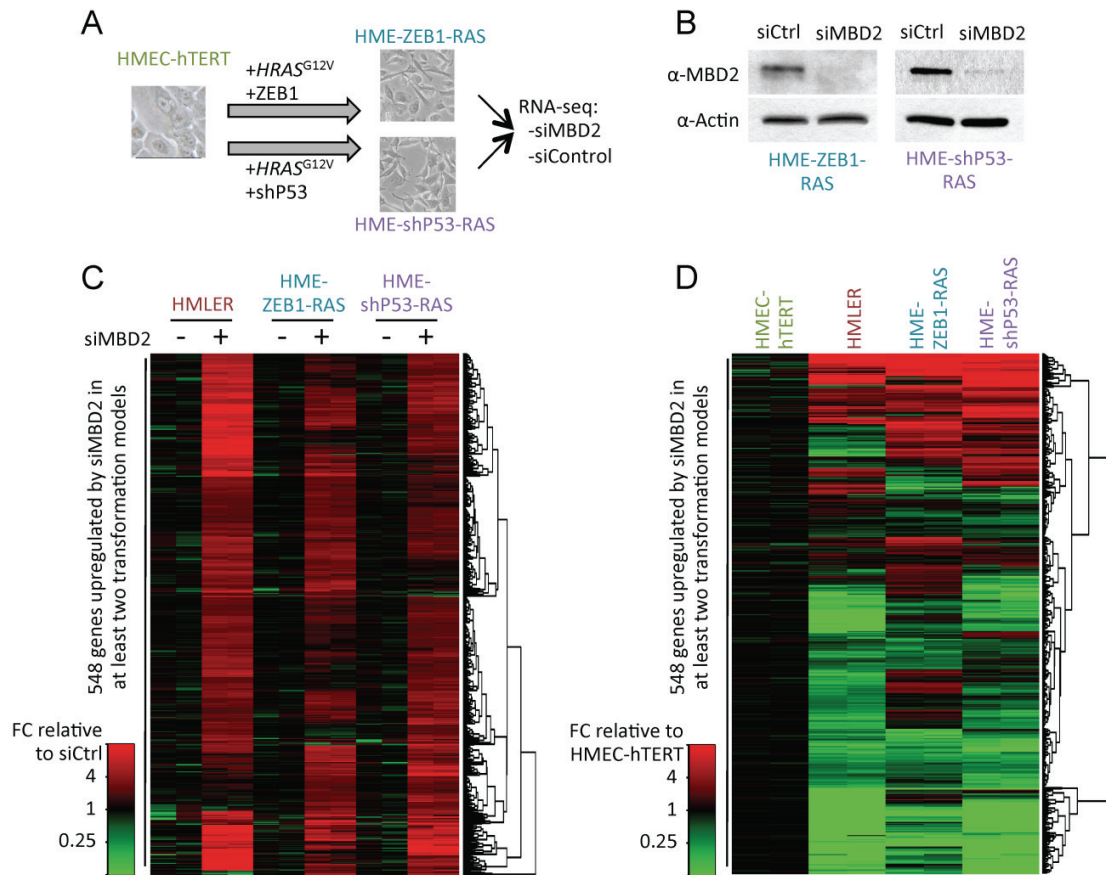


Fig 6 Devailly et al.

Figure 6. MBD2 repressed a common set of genes during oncogenic transformation. (A) Experimental scheme of generation of 2 cell lines from HMEC-hTERT cells by oncogenic transformation. HME-ZEB1-RAS cells were obtained by the expression of the embryonic transcription factor ZEB1 and H-RAS^{V12}, and HME-shP53-RAS cells were obtained by the expression of a shRNA targeting P53 and H-RAS^{V12} genes. (B) Immunoblot analysis of MBD2 protein level in HME-ZEB1-RAS and HME-shP53-RAS upon siRNA treatment targeting *MBD2*. (C and D) Heat maps summarizing genes downregulated (green) or upregulated (red). (C) A set of 548 genes was upregulated in MBD2 knockdown cell lines (D) Most of these genes upregulated by siRNA against MBD2 in transformed cell lines were genes that are downregulated during oncogenic transformation.

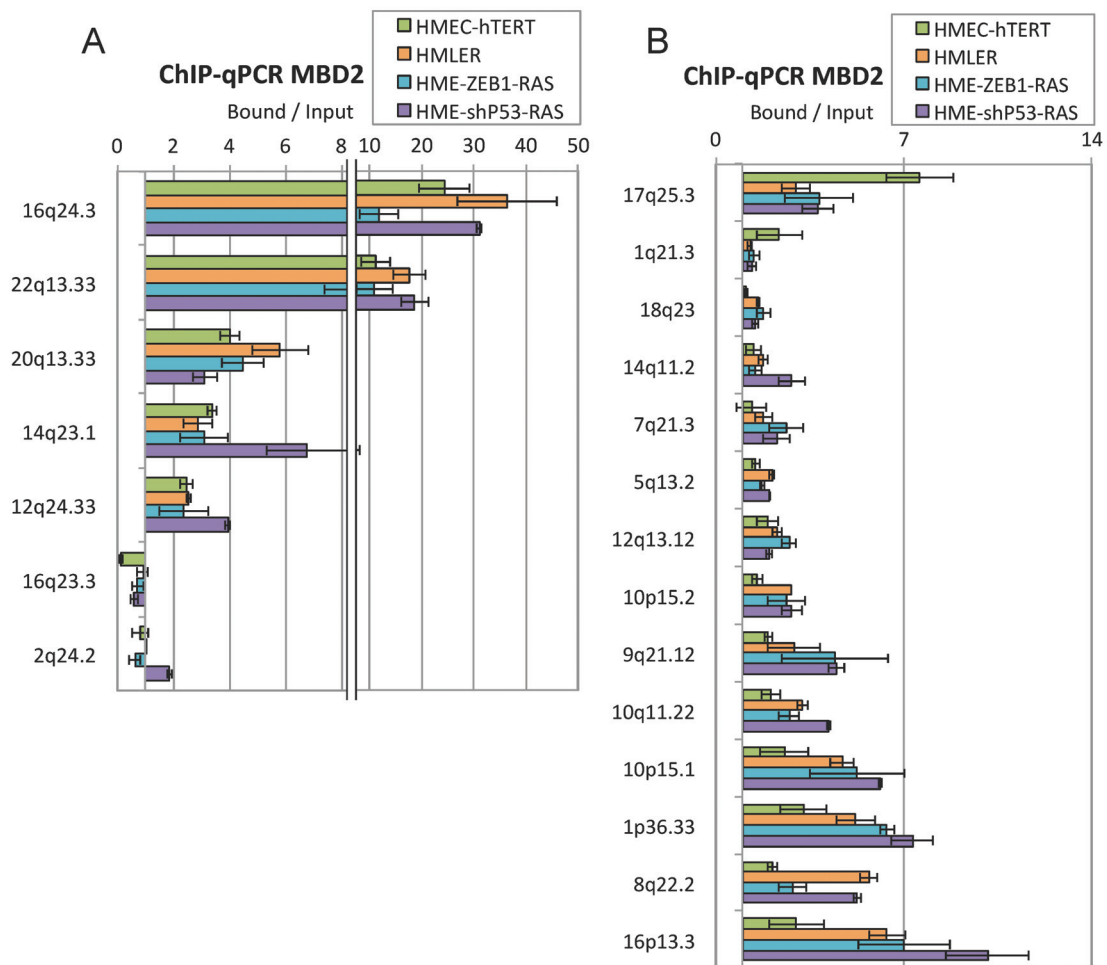


Fig 7 Devailly et al.

Figure 7. MBD2 ChIP-qPCR experiments from HMEC-HTERT, HMLER, HME-ZB1-RAS, and HME-shP53 cell lines. Error bars represent average deviation from 2 independent experiments. (A) MBD2 binding at several positive and negative regions. (B) MBD2 redistribution in the genome during oncogenic transformation was frequently concordant in the different transformed cell lines.

SUPPLEMENTAL FIGURES

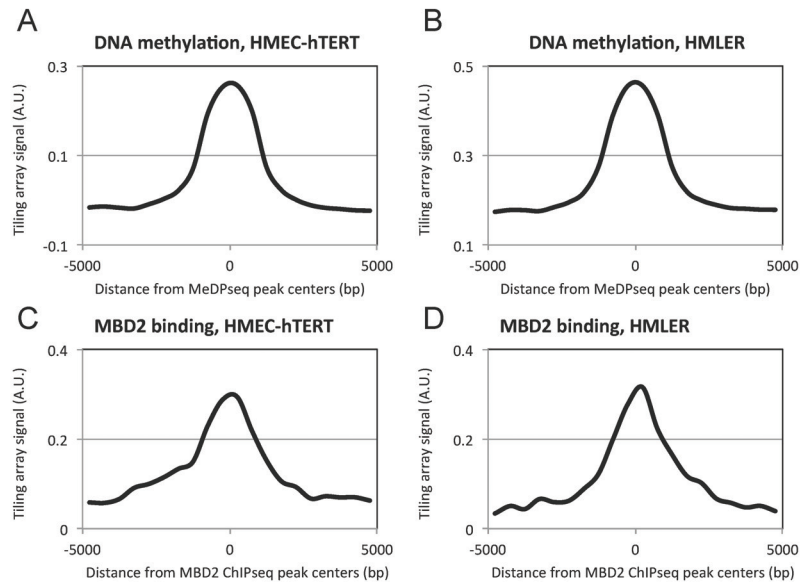


Fig S1 Devailly et al.

Figure S1. Comparison between high-throughput sequencing and tiling array technologies. Mean signals from Affymetrix Human Promoter 1.0R tiling arrays were computed at peaks identified from MeDPseq or MBD2 ChIP sequencing experiments. (A-B) MeDP-chip signals, obtained from a recombinant protein containing 4 MBD domains from MBD1, were compared with MeDP sequencing, performed from Invitrogen MethylMiner, in HMEC-hTERT (A) and HMLER (B). (C-D) MBD2 ChIP-chip were compared with MBD2 ChIPseq in HMEC-hTERT (C) and HMLER (D). A.U., Arbitrary Unit.

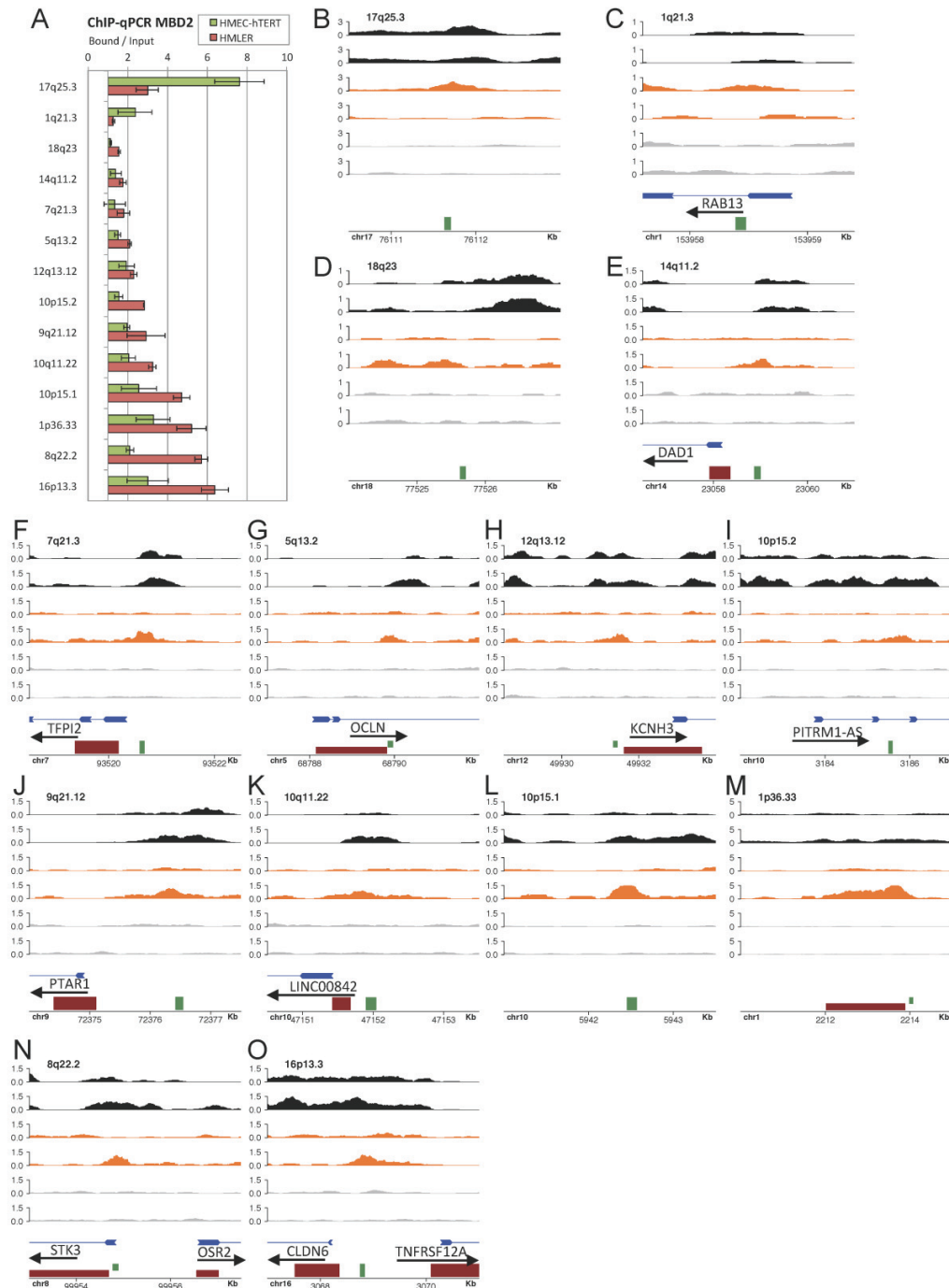


Fig S2 Devailly et al.

Figure S2. Examples of MBD2 redistribution during oncogenic transformation. (A) ChIP-qPCR experiments performed with anti-MBD2 antibodies in HMEC-hTERT cells (green) and HMLER cells (red). Each experiment was performed 2 times. (B to O) Genome coverage for MeDP-seq (black), ChIP-MBD2-seq (orange) and Input-seq (gray) in HMEC-hTERT (upper tracks) and HMLER (bottom tracks) at 14 genomic locations tested in A. Scale is in

Fragments Per Million (FPM). Blue: Gene. Red: CpG island. Green: qPCR amplicon localization.

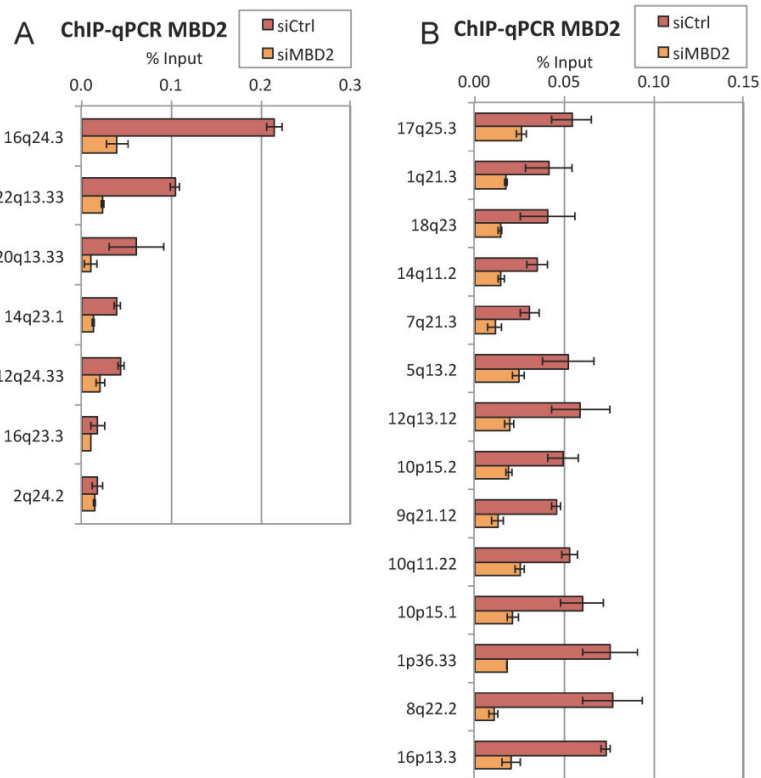


Fig S3 Devailly et al.

Figure S3. Depletion of MBD2 by siRNA strongly decreased MBD2 ChIP efficiency. ChIP-qPCR experiments were performed in HMLER cells treated with a siRNA control (siCtrl) or a siRNA targeting *MBD2* (siMBD2). Each experiment was performed 2 times. (A) Shown regions correspond to the regions analyzed in Figure 2. (B) Shown regions correspond to the regions analyzed in Figure S2.

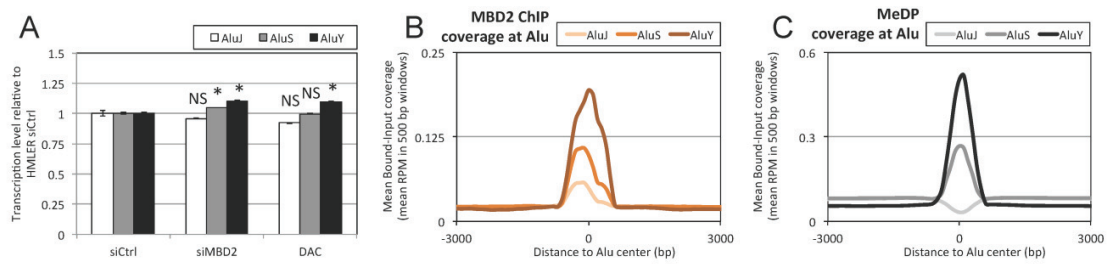


Fig S4 Devailly et al.

Figure S4. Transcription at AluY element sites is repressed by MBD2 and DNA methylation. (A) Relative transcription level at AluJ, AluS and AluY element sites in HMLER, as detected by RNA sequencing. HMLER cells were treated with control siRNA (siCtrl), siRNA targeting *MBD2* (siMBD2) or 5-aza-deoxycytidine (DAC). Student t-test relative to siCtrl conditions. * p-value ≤ 0.01 . N.S. Non significant. (B) MB2 ChIPseq mean coverages at AluJ, AluS and AluY elements. (C) MeDPseq mean coverages at AluJ, AluS and AluY elements.

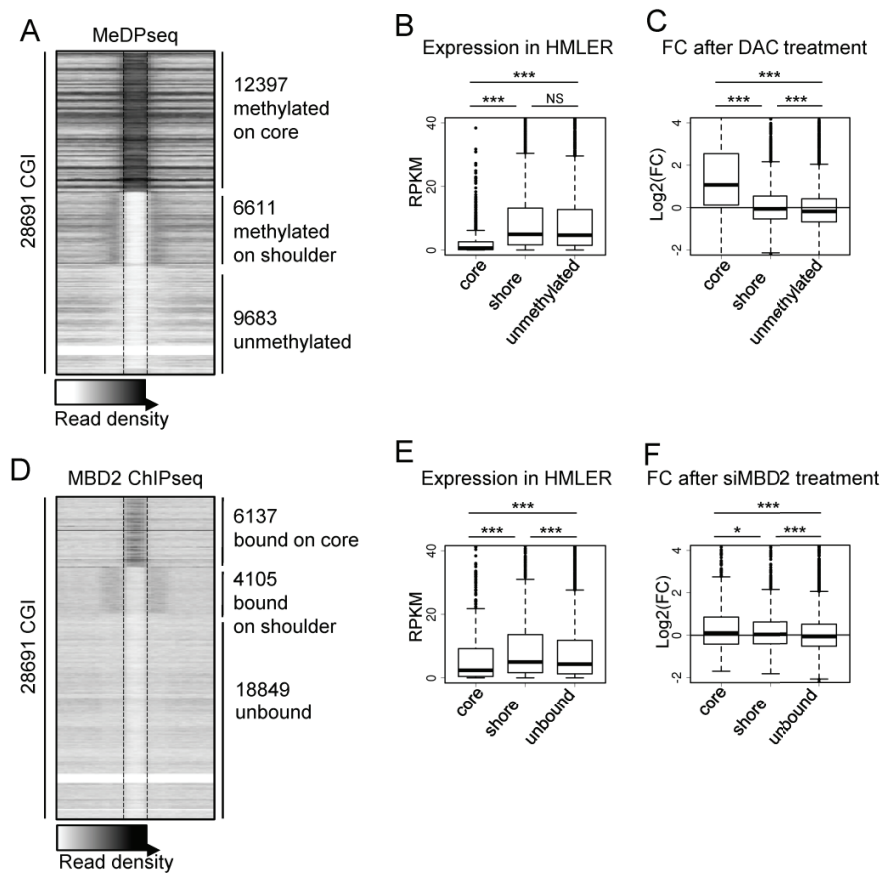


Fig S5 Devailly et al.

Figure S5: DNA methylation and MBD2 binding on CpG island (CGI) cores and shores. (A) MeDPseq coverage at CpG island after clusterisation. (B-C) Basal expression in HMLER (B) and fold change (FC) after 5-aza-deoxycytidine treatment (DAC) (C) for genes with a core methylated CpG island (core), with a shore methylated CpG island (shore) or with an unmethylated CpG island (unmethylated) within 1kb of their TSS. (D) MBD2 ChIPseq coverage at CpG island after clusterisation. (E-F) Basal expression in HMLER (E) and fold change (FC) after siRNA targeting *MBD2* treatment (F) for genes with a CpG island core bound by MBD2 (core), with a CpG island shore bound by MBD2 (shore) or with an MBD2 unbound CpG island (unbound) within 1kb of their TSS. Wilcoxon tests: N.S. Non significant. * $p < 0.05$. *** $p < 0.001$

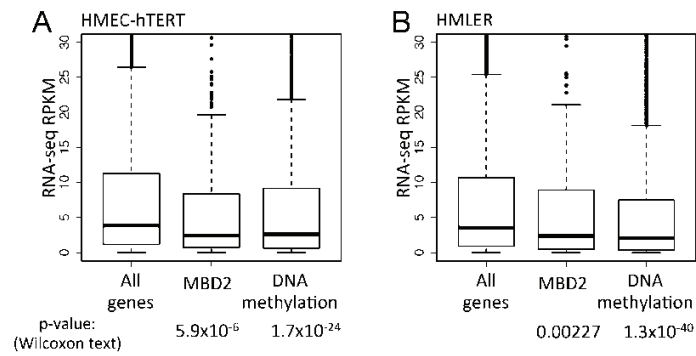


Fig S6 Devailly et al.

Figure S6. Genes exhibiting MBD2 binding sites or with DNA methylation at their TSS regions have low transcriptional activity. Box-plots showing gene expression levels, determined from RNA-seq, of the total number of genes, genes with MBD2 peaks within +/- 1kb of their TSS, or genes with MeDP peaks within +/- 1kb of their TSS in (A) HMEC-hTERT cells and (B) HMLER cells.

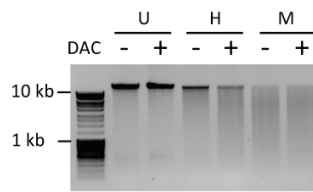


Fig S7 Devailly et al.

Figure S7. 5-aza-deoxycytidine treatment induced DNA demethylation. Digested and undigested genomic DNA was analyzed on 1% agarose gel. DAC: 5-aza-deoxycytidine. U: undigested. H: digested with the methylation sensitive enzyme HpaII. M: digested with the methylation insensitive enzyme MspI.

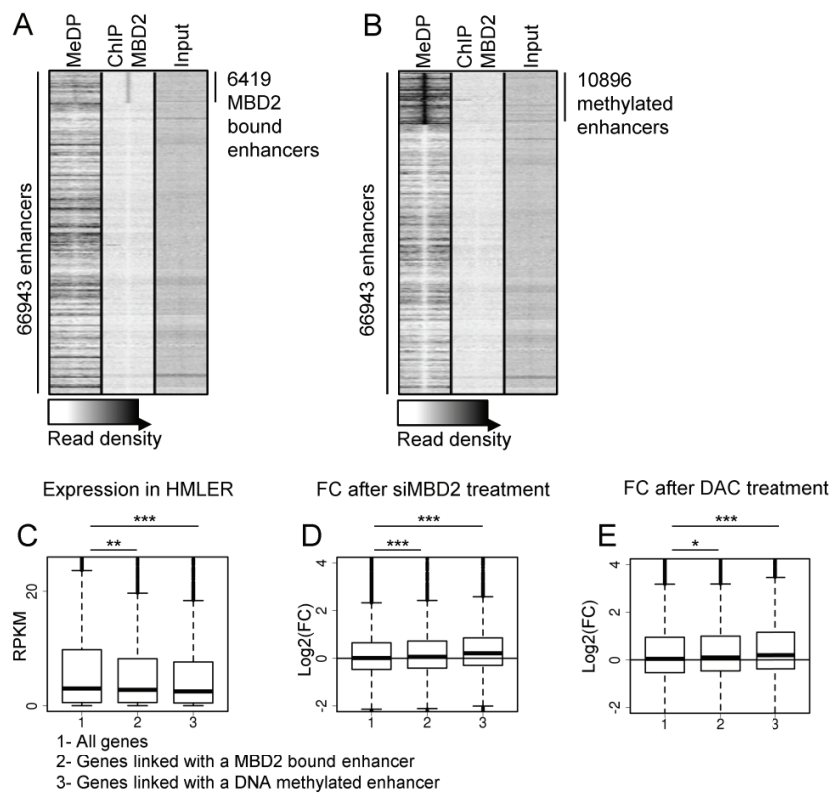


Figure S8: DNA methylation and MBD2 binding on enhancers. (A-B) MeDPseq, MBD2 ChIPseq and Input-seq coverage at enhancer after clusterisation. (A) Clusterisation performed on MBD2 ChIPseq read density. (B) Clusterisation performed of MeDPseq read density. (C-E) Basal expression in HMLER (C) and fold change (FC) after an siRNA targeting MBD2 treatment (D) or a 5-aza-deoxycytidine (DAC) treatment (E) for all genes (1), for genes associated with a MBD2-bound enhancer (2) or for genes associated with a methylated enhancer (3) as identified in A and B. Wilcoxon tests: * $p < 0.05$. ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$

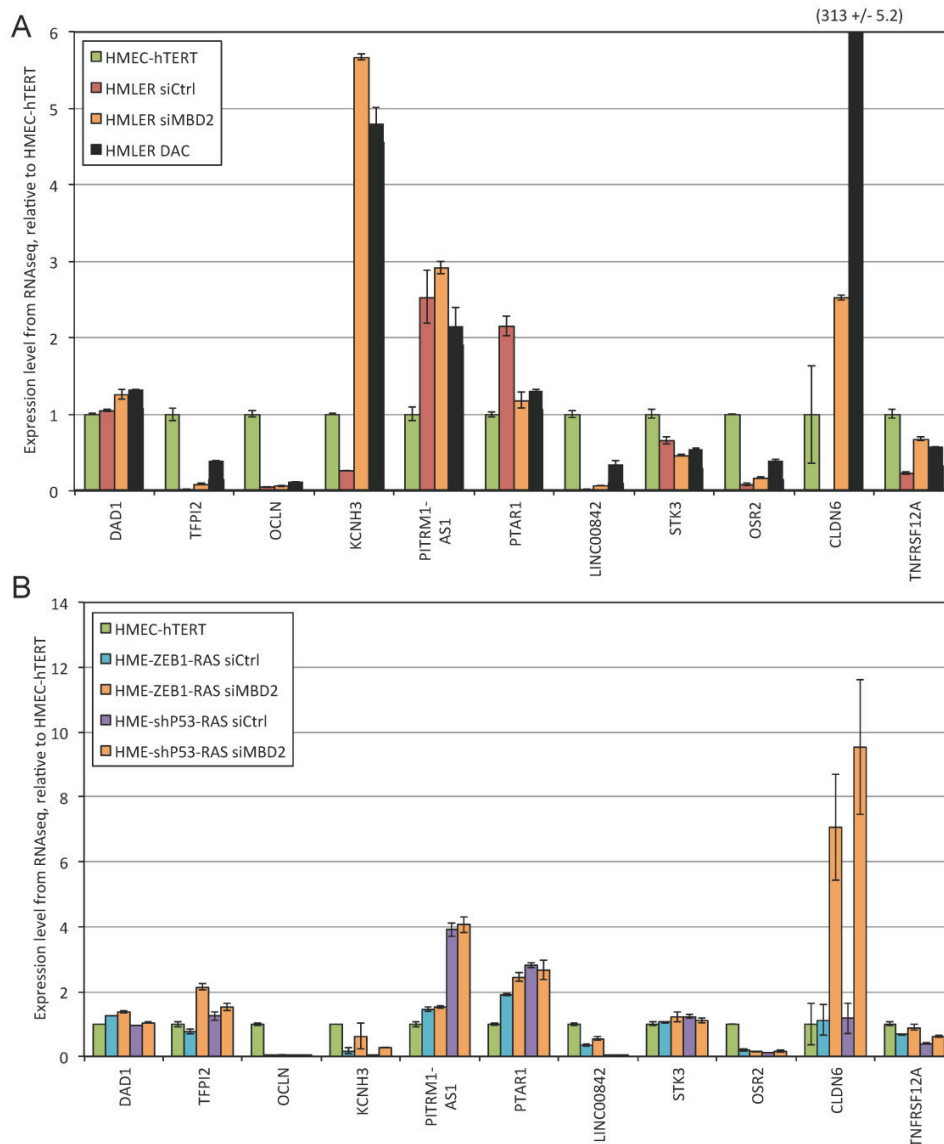


Fig S9 Devailly et al.

Figure S9. Expression levels of genes gaining MBD2 at their TSS regions in HMLER, HME-ZEB1-RAS, and HME-shP53-RAS cells compared with HMEC-hTERT cells (see Figure S2 and Figure 7B). For each gene, relative values were determined using 1 for the expression level in HMEC-hTERT cells. (A) Green: Expression level in HMEC-hTERT. Red: Expression level in HMLER treated with a control siRNA. Orange: Expression level in HMLER treated with siRNA against *MBD2*. Black: Expression level in HMLER treated with DAC (5-aza-deoxycytidine). Error bars from duplicate RNAseq experiments. (B) Green: Expression level in HMEC-hTERT. Blue: Expression level in HME-ZEB1-RAS treated with a control siRNA. Purple: Expression level in HME-shP53-RAS treated with a control siRNA. Orange: Expression level in HME-ZEB1-RAS or HME-shP53-RAS treated with a siRNA against *MBD2*. Error bars from duplicate RNAseq experiments.

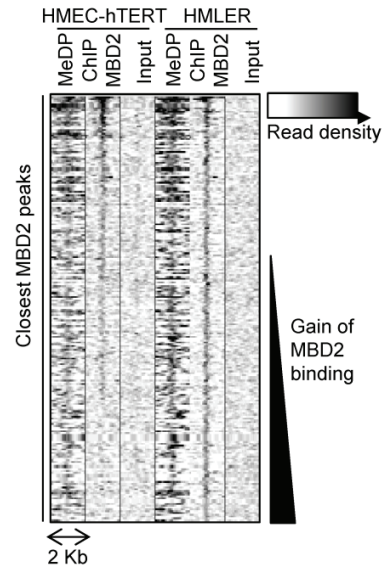


Fig S10 Devailly et al.

Figure S10: Gain of MBD2 binding near the transcription start sites of 247 genes, repressed during oncogenic transformation, and upregulated by a siMBD2 treatment in at least two of the three studied transformed cell lines (see figure 6C and 6D).

6 BIBLIOGRAPHIE

1. Society., A.C., *Global Cancer Facts & Figures 3rd Edition*. Atlanta: American Cancer Society
2015.
2. The Surveillance, E., and End Results (SEER), National Cancer Institute, *ER Research Data 1973-2012*. Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program (www.seer.cancer.gov) 2014.
3. Stratton, M.R., P.J. Campbell, and P.A. Futreal, *The cancer genome*. Nature, 2009. **458**(7239): p. 719-24.
4. Berger, A.H., A.G. Knudson, and P.P. Pandolfi, *A continuum model for tumour suppression*. Nature, 2011. **476**(7359): p. 163-9.
5. Chin, K., et al., *In situ analyses of genome instability in breast cancer*. Nat Genet, 2004. **36**(9): p. 984-8.
6. Cheng, N., et al., *Transforming growth factor-beta signaling-deficient fibroblasts enhance hepatocyte growth factor signaling in mammary carcinoma cells to promote scattering and invasion*. Mol Cancer Res, 2008. **6**(10): p. 1521-33.
7. Hanahan, D. and J. Folkman, *Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis*. Cell, 1996. **86**(3): p. 353-64.
8. Talmadge, J.E. and I.J. Fidler, *AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective*. Cancer Res, 2010. **70**(14): p. 5649-69.
9. Ansieau, S., et al., *Early origin of cancer metastases: dissemination and evolution of premalignant cells*. Cell Cycle, 2008. **7**(23): p. 3659-63.
10. Markkanen, E., et al., *Cells deficient in base-excision repair reveal cancer hallmarks originating from adjustments to genetic instability*. Nucleic Acids Res, 2015. **43**(7): p. 3667-79.
11. Lord, C.J. and A. Ashworth, *The DNA damage response and cancer therapy*. Nature, 2012. **481**(7381): p. 287-94.
12. Hoeijmakers, J.H., *DNA damage, aging, and cancer*. N Engl J Med, 2009. **361**(15): p. 1475-85.
13. Phillips, D.H., et al., *Correlation of DNA adduct levels in human lung with cigarette smoking*. Nature, 1988. **336**(6201): p. 790-2.
14. Ciccia, A. and S.J. Elledge, *The DNA damage response: making it safe to play with knives*. Mol Cell, 2010. **40**(2): p. 179-204.
15. David, S.S., V.L. O'Shea, and S. Kundu, *Base-excision repair of oxidative DNA damage*. Nature, 2007. **447**(7147): p. 941-50.
16. Cleaver, J.E., E.T. Lam, and I. Revet, *Disorders of nucleotide excision repair: the genetic and molecular basis of heterogeneity*. Nat Rev Genet, 2009. **10**(11): p. 756-68.
17. Lieber, M.R., *NHEJ and its backup pathways in chromosomal translocations*. Nat Struct Mol Biol, 2010. **17**(4): p. 393-5.
18. Moynahan, M.E. and M. Jasin, *Mitotic homologous recombination maintains genomic stability and suppresses tumorigenesis*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2010. **11**(3): p. 196-207.

19. Haynes, B., et al., *Crosstalk between translesion synthesis, Fanconi anemia network, and homologous recombination repair pathways in interstrand DNA crosslink repair and development of chemoresistance*. *Mutat Res Rev Mutat Res*, 2015. **763**: p. 258-66.
20. Moon, A.F., et al., *The X family portrait: structural insights into biological functions of X family polymerases*. *DNA Repair (Amst)*, 2007. **6**(12): p. 1709-25.
21. Yang, W. and R. Woodgate, *What a difference a decade makes: insights into translesion DNA synthesis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. **104**(40): p. 15591-8.
22. Lawrence, C.W. and V.M. Maher, *Mutagenesis in eukaryotes dependent on DNA polymerase zeta and Rev1p*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2001. **356**(1405): p. 41-6.
23. Lane, D.P., *Cancer. p53, guardian of the genome*. *Nature*, 1992. **358**(6381): p. 15-6.
24. Artandi, S.E. and R.A. DePinho, *Telomeres and telomerase in cancer*. *Carcinogenesis*, 2010. **31**(1): p. 9-18.
25. Lengauer, C., K.W. Kinzler, and B. Vogelstein, *Genetic instabilities in human cancers*. *Nature*, 1998. **396**(6712): p. 643-9.
26. Tomasetti, C. and B. Vogelstein, *Cancer etiology. Variation in cancer risk among tissues can be explained by the number of stem cell divisions*. *Science*, 2015. **347**(6217): p. 78-81.
27. Vogelstein, B., et al., *Cancer genome landscapes*. *Science*, 2013. **339**(6127): p. 1546-58.
28. Coleman, M.P., et al., *Cancer survival in five continents: a worldwide population-based study (CONCORD)*. *Lancet Oncol*, 2008. **9**(8): p. 730-56.
29. Parker, J.S., et al., *Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes*. *J Clin Oncol*, 2009. **27**(8): p. 1160-7.
30. Perou, C.M., et al., *Molecular portraits of human breast tumours*. *Nature*, 2000. **406**(6797): p. 747-52.
31. Sorlie, T., et al., *Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(14): p. 8418-23.
32. Andre, F., J. Domont, and S. Delaloge, *What can breast cancer molecular subclassification add to conventional diagnostic tools?* *Ann Oncol*, 2007. **18 Suppl 9**: p. ix33-6.
33. *Comprehensive molecular portraits of human breast tumours*. *Nature*, 2012. **490**(7418): p. 61-70.
34. Paik, S., et al., *A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer*. *N Engl J Med*, 2004. **351**(27): p. 2817-26.
35. Filipits, M., et al., *A new molecular predictor of distant recurrence in ER-positive, HER2-negative breast cancer adds independent information to conventional clinical risk factors*. *Clin Cancer Res*, 2011. **17**(18): p. 6012-20.
36. Dubsy, P., et al., *The EndoPredict score provides prognostic information on late distant metastases in ER+/HER2- breast cancer patients*. *Br J Cancer*, 2013. **109**(12): p. 2959-64.
37. Filipits, M., et al., *The PAM50 risk-of-recurrence score predicts risk for late distant recurrence after endocrine therapy in postmenopausal women with endocrine-responsive early breast cancer*. *Clin Cancer Res*, 2014. **20**(5): p. 1298-305.
38. Gnant, M., et al., *Predicting distant recurrence in receptor-positive breast cancer patients with limited clinicopathological risk: using the PAM50 Risk of Recurrence score in 1478 postmenopausal patients of the ABCSG-8 trial treated with adjuvant endocrine therapy alone*. *Ann Oncol*, 2014. **25**(2): p. 339-45.

39. Loibl, S., et al., *PIK3CA mutations are associated with lower rates of pathologic complete response to anti-human epidermal growth factor receptor 2 (her2) therapy in primary HER2-overexpressing breast cancer*. *J Clin Oncol*, 2014. **32**(29): p. 3212-20.
40. Dietel, M., et al., *A 2015 update on predictive molecular pathology and its role in targeted cancer therapy: a review focussing on clinical relevance*. *Cancer Gene Ther*, 2015.
41. Anderson, W.F., et al., *How many etiological subtypes of breast cancer: two, three, four, or more?* *J Natl Cancer Inst*, 2014. **106**(8).
42. Thunnissen, E., et al., *EML4-ALK testing in non-small cell carcinomas of the lung: a review with recommendations*. *Virchows Arch*, 2012. **461**(3): p. 245-57.
43. Dietel, M., et al., *Predictive molecular pathology and its role in targeted cancer therapy: a review focussing on clinical relevance*. *Cancer Gene Ther*, 2013. **20**(4): p. 211-21.
44. Lindeman, N.I., et al., *Molecular testing guideline for selection of lung cancer patients for EGFR and ALK tyrosine kinase inhibitors: guideline from the College of American Pathologists, International Association for the Study of Lung Cancer, and Association for Molecular Pathology*. *Arch Pathol Lab Med*, 2013. **137**(6): p. 828-60.
45. McCoach, C.E. and R.C. Doebele, *The minority report: targeting the rare oncogenes in NSCLC*. *Curr Treat Options Oncol*, 2014. **15**(4): p. 644-57.
46. Allouche, M., *ALK is a novel dependence receptor: potential implications in development and cancer*. *Cell Cycle*, 2007. **6**(13): p. 1533-8.
47. You, J.S. and P.A. Jones, *Cancer genetics and epigenetics: two sides of the same coin?* *Cancer Cell*, 2012. **22**(1): p. 9-20.
48. Shen, H. and P.W. Laird, *Interplay between the cancer genome and epigenome*. *Cell*, 2013. **153**(1): p. 38-55.
49. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. *Cell*, 2011. **144**(5): p. 646-74.
50. de Souza, N., *The ENCODE project*. *Nat Methods*, 2012. **9**(11): p. 1046.
51. Heyn, H. and M. Esteller, *DNA methylation profiling in the clinic: applications and challenges*. *Nat Rev Genet*, 2012. **13**(10): p. 679-92.
52. Sandoval, J. and M. Esteller, *Cancer epigenomics: beyond genomics*. *Curr Opin Genet Dev*, 2012. **22**(1): p. 50-5.
53. Stephens, P.J., et al., *The landscape of cancer genes and mutational processes in breast cancer*. *Nature*, 2012. **486**(7403): p. 400-4.
54. Kim, H.S., J.D. Minna, and M.A. White, *GWAS meets TCGA to illuminate mechanisms of cancer predisposition*. *Cell*, 2013. **152**(3): p. 387-9.
55. Rivera, C.M. and B. Ren, *Mapping human epigenomes*. *Cell*, 2013. **155**(1): p. 39-55.
56. Siggins, L. and K. Ekwall, *Epigenetics, chromatin and genome organization: recent advances from the ENCODE project*. *J Intern Med*, 2014. **276**(3): p. 201-14.
57. *TCGA finds thyroid cancer drivers, subtypes*. *Cancer Discov*, 2015. **5**(1): p. 5.
58. *TCGA Releases Head and Neck Cancer Data*. *Cancer Discov*, 2015. **5**(4): p. 340-1.
59. Zhu, Y., et al., *Zodiac: A Comprehensive Depiction of Genetic Interactions in Cancer by Integrating TCGA Data*. *J Natl Cancer Inst*, 2015. **107**(8).
60. Sharma, S., T.K. Kelly, and P.A. Jones, *Epigenetics in cancer*. *Carcinogenesis*, 2010. **31**(1): p. 27-36.
61. Jones, P.A., *Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond*. *Nat Rev Genet*, 2012. **13**(7): p. 484-92.
62. Yang, X., et al., *Gene body methylation can alter gene expression and is a therapeutic target in cancer*. *Cancer Cell*, 2014. **26**(4): p. 577-90.

63. Ito, S., et al., *Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine*. *Science*, 2011. **333**(6047): p. 1300-3.
64. Gaffney, D.J., et al., *Controls of nucleosome positioning in the human genome*. *PLoS Genet*, 2012. **8**(11): p. e1003036.
65. Tessarz, P. and T. Kouzarides, *Histone core modifications regulating nucleosome structure and dynamics*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014. **15**(11): p. 703-8.
66. Devailly, G., et al., *Dynamics of MBD2 deposition across methylated DNA regions during malignant transformation of human mammary epithelial cells*. *Nucleic Acids Res*, 2015. **43**(12): p. 5838-54.
67. Lee, J.T., *Epigenetic regulation by long noncoding RNAs*. *Science*, 2012. **338**(6113): p. 1435-9.
68. Wang, J., et al., *Factorbook.org: a Wiki-based database for transcription factor-binding data generated by the ENCODE consortium*. *Nucleic Acids Res*, 2013. **41**(Database issue): p. D171-6.
69. Bhaumik, S.R., E. Smith, and A. Shilatifard, *Covalent modifications of histones during development and disease pathogenesis*. *Nat Struct Mol Biol*, 2007. **14**(11): p. 1008-16.
70. Wiedemann, S.M., et al., *Identification and characterization of two novel primate-specific histone H3 variants, H3.X and H3.Y*. *J Cell Biol*, 2010. **190**(5): p. 777-91.
71. He, L. and G.J. Hannon, *MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation*. *Nat Rev Genet*, 2004. **5**(7): p. 522-31.
72. Ruvkun, G., *The perfect storm of tiny RNAs*. *Nat Med*, 2008. **14**(10): p. 1041-5.
73. Ohtsuka, M., et al., *MicroRNA Processing and Human Cancer*. *J Clin Med*, 2015. **4**(8): p. 1651-67.
74. Gupta, R.A., et al., *Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis*. *Nature*, 2010. **464**(7291): p. 1071-6.
75. Schoof, C.R., et al., *MicroRNAs in cancer treatment and prognosis*. *Am J Cancer Res*, 2012. **2**(4): p. 414-33.
76. Ribeiro, A.O., et al., *MicroRNAs: modulators of cell identity, and their applications in tissue engineering*. *Microna*, 2014. **3**(1): p. 45-53.
77. Hotchkiss, R.D., *The quantitative separation of purines, pyrimidines, and nucleosides by paper chromatography*. *J Biol Chem*, 1948. **175**(1): p. 315-32.
78. Tippin, D.B., B. Ramakrishnan, and M. Sundaralingam, *Methylation of the Z-DNA decamer d(GC)5 potentiates the formation of A-DNA: crystal structure of d(Gm5CGm5CGCGCGC)*. *J Mol Biol*, 1997. **270**(2): p. 247-58.
79. Shen, J.C., W.M. Rideout, 3rd, and P.A. Jones, *The rate of hydrolytic deamination of 5-methylcytosine in double-stranded DNA*. *Nucleic Acids Res*, 1994. **22**(6): p. 972-6.
80. Chahwan, R., S.N. Wontakal, and S. Roa, *Crosstalk between genetic and epigenetic information through cytosine deamination*. *Trends Genet*, 2010. **26**(10): p. 443-8.
81. Smith, S.S., et al., *Mechanism of human methyl-directed DNA methyltransferase and the fidelity of cytosine methylation*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992. **89**(10): p. 4744-8.
82. Klimasauskas, S., et al., *HhaI methyltransferase flips its target base out of the DNA helix*. *Cell*, 1994. **76**(2): p. 357-69.
83. Song, J., et al., *Structure of DNMT1-DNA complex reveals a role for autoinhibition in maintenance DNA methylation*. *Science*, 2011. **331**(6020): p. 1036-40.
84. Goll, M.G., et al., *Methylation of tRNA^{Asp} by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2*. *Science*, 2006. **311**(5759): p. 395-8.

85. Chedin, F., M.R. Lieber, and C.L. Hsieh, *The DNA methyltransferase-like protein DNMT3L stimulates de novo methylation by Dnmt3a*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(26): p. 16916-21.
86. Deplus, R., et al., *Dnmt3L is a transcriptional repressor that recruits histone deacetylase*. Nucleic Acids Res, 2002. **30**(17): p. 3831-8.
87. Hamidi, T., A.K. Singh, and T. Chen, *Genetic alterations of DNA methylation machinery in human diseases*. Epigenomics, 2015. **7**(2): p. 247-65.
88. Jones, P.A. and G. Liang, *Rethinking how DNA methylation patterns are maintained*. Nat Rev Genet, 2009. **10**(11): p. 805-11.
89. Tahiliani, M., et al., *Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1*. Science, 2009. **324**(5929): p. 930-5.
90. Jin, S.G., et al., *Genomic mapping of 5-hydroxymethylcytosine in the human brain*. Nucleic Acids Res, 2011. **39**(12): p. 5015-24.
91. Spruijt, C.G., et al., *Dynamic readers for 5-(hydroxy)methylcytosine and its oxidized derivatives*. Cell, 2013. **152**(5): p. 1146-59.
92. Etchegaray, J.P., et al., *The histone deacetylase SIRT6 controls embryonic stem cell fate via TET-mediated production of 5-hydroxymethylcytosine*. Nat Cell Biol, 2015. **17**(5): p. 545-57.
93. Bird, A., et al., *A fraction of the mouse genome that is derived from islands of nonmethylated, CpG-rich DNA*. Cell, 1985. **40**(1): p. 91-9.
94. Antequera, F. and A. Bird, *Number of CpG islands and genes in human and mouse*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(24): p. 11995-9.
95. Bird, A.P., *CpG-rich islands and the function of DNA methylation*. Nature, 1986. **321**(6067): p. 209-13.
96. Gardiner-Garden, M. and M. Frommer, *CpG islands in vertebrate genomes*. J Mol Biol, 1987. **196**(2): p. 261-82.
97. Huang, T.H. and M. Esteller, *Chromatin remodeling in mammary gland differentiation and breast tumorigenesis*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2010. **2**(9): p. a004515.
98. Takai, D. and P.A. Jones, *Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(6): p. 3740-5.
99. Saxonov, S., P. Berg, and D.L. Brutlag, *A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(5): p. 1412-7.
100. Cedar, H., *DNA methylation and gene activity*. Cell, 1988. **53**(1): p. 3-4.
101. Buck-Koehntop, B.A. and P.A. Defossez, *On how mammalian transcription factors recognize methylated DNA*. Epigenetics, 2013. **8**(2): p. 131-7.
102. Mohandas, T., R.S. Sparkes, and L.J. Shapiro, *Reactivation of an inactive human X chromosome: evidence for X inactivation by DNA methylation*. Science, 1981. **211**(4480): p. 393-6.
103. Bird, A., *DNA methylation patterns and epigenetic memory*. Genes Dev, 2002. **16**(1): p. 6-21.
104. Bhutani, N., et al., *Reprogramming towards pluripotency requires AID-dependent DNA demethylation*. Nature, 2010. **463**(7284): p. 1042-7.
105. Toyota, M., et al., *CpG island methylator phenotype in colorectal cancer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(15): p. 8681-6.
106. Toyota, M., et al., *Aberrant methylation in gastric cancer associated with the CpG island methylator phenotype*. Cancer Res, 1999. **59**(21): p. 5438-42.

107. Weisenberger, D.J., et al., *CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer*. Nat Genet, 2006. **38**(7): p. 787-93.
108. Hinoue, T., et al., *Genome-scale analysis of aberrant DNA methylation in colorectal cancer*. Genome Res, 2012. **22**(2): p. 271-82.
109. Suzuki, H., et al., *Biological significance of the CpG island methylator phenotype*. Biochem Biophys Res Commun, 2014. **455**(1-2): p. 35-42.
110. Tahara, T. and T. Arisawa, *DNA methylation as a molecular biomarker in gastric cancer*. Epigenomics, 2015. **7**(3): p. 475-86.
111. Berman, B.P., et al., *Regions of focal DNA hypermethylation and long-range hypomethylation in colorectal cancer coincide with nuclear lamina-associated domains*. Nat Genet, 2012. **44**(1): p. 40-6.
112. Timp, W. and A.P. Feinberg, *Cancer as a dysregulated epigenome allowing cellular growth advantage at the expense of the host*. Nat Rev Cancer, 2013. **13**(7): p. 497-510.
113. Wolf, S.F., et al., *Methylation of the hypoxanthine phosphoribosyltransferase locus on the human X chromosome: implications for X-chromosome inactivation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1984. **81**(9): p. 2806-10.
114. Hellman, A. and A. Chess, *Gene body-specific methylation on the active X chromosome*. Science, 2007. **315**(5815): p. 1141-3.
115. Jones, P.A., *The DNA methylation paradox*. Trends Genet, 1999. **15**(1): p. 34-7.
116. Maunakea, A.K., et al., *Conserved role of intragenic DNA methylation in regulating alternative promoters*. Nature, 2010. **466**(7303): p. 253-7.
117. Yoder, J.A., C.P. Walsh, and T.H. Bestor, *Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites*. Trends Genet, 1997. **13**(8): p. 335-40.
118. Schwartz, S., E. Meshorer, and G. Ast, *Chromatin organization marks exon-intron structure*. Nat Struct Mol Biol, 2009. **16**(9): p. 990-5.
119. Chodavarapu, R.K., et al., *Relationship between nucleosome positioning and DNA methylation*. Nature, 2010. **466**(7304): p. 388-92.
120. Laurent, L., et al., *Dynamic changes in the human methylome during differentiation*. Genome Res, 2010. **20**(3): p. 320-31.
121. Bell, A.C. and G. Felsenfeld, *Methylation of a CTCF-dependent boundary controls imprinted expression of the Igf2 gene*. Nature, 2000. **405**(6785): p. 482-5.
122. Shukla, S., et al., *CTCF-promoted RNA polymerase II pausing links DNA methylation to splicing*. Nature, 2011. **479**(7371): p. 74-9.
123. Futscher, B.W., et al., *Role for DNA methylation in the control of cell type specific maspin expression*. Nat Genet, 2002. **31**(2): p. 175-9.
124. Eckhardt, F., et al., *DNA methylation profiling of human chromosomes 6, 20 and 22*. Nat Genet, 2006. **38**(12): p. 1378-85.
125. Jones, P.A. and S.M. Taylor, *Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation*. Cell, 1980. **20**(1): p. 85-93.
126. Jove, R., D.E. Sperber, and J.L. Manley, *Transcription of methylated eukaryotic viral genes in a soluble in vitro system*. Nucleic Acids Res, 1984. **12**(11): p. 4715-30.
127. Molloy, P.L., *Effects of DNA methylation on specific transcription by RNA polymerase II in vitro*. Mol Biol Rep, 1986. **11**(1): p. 13-7.
128. Hamelin, R., *[Epigenetic changes and cancer]*. Ann Pathol, 2009. **29 Spec No 1**: p. S17-8.
129. Ooi, S.K., et al., *DNMT3L connects unmethylated lysine 4 of histone H3 to de novo methylation of DNA*. Nature, 2007. **448**(7154): p. 714-7.

130. Hark, A.T., et al., *CTCF mediates methylation-sensitive enhancer-blocking activity at the H19/Igf2 locus*. Nature, 2000. **405**(6785): p. 486-9.
131. Kanduri, C., et al., *Functional association of CTCF with the insulator upstream of the H19 gene is parent of origin-specific and methylation-sensitive*. Curr Biol, 2000. **10**(14): p. 853-6.
132. Iguchi-Arigo, S.M. and W. Schaffner, *CpG methylation of the cAMP-responsive enhancer/promoter sequence TGACGTCA abolishes specific factor binding as well as transcriptional activation*. Genes Dev, 1989. **3**(5): p. 612-9.
133. Campanero, M.R., M.I. Armstrong, and E.K. Flemington, *CpG methylation as a mechanism for the regulation of E2F activity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(12): p. 6481-6.
134. Prendergast, G.C. and E.B. Ziff, *Methylation-sensitive sequence-specific DNA binding by the c-Myc basic region*. Science, 1991. **251**(4990): p. 186-9.
135. Unoki, M., T. Nishidate, and Y. Nakamura, *ICBP90, an E2F-1 target, recruits HDAC1 and binds to methyl-CpG through its SRA domain*. Oncogene, 2004. **23**(46): p. 7601-10.
136. Lewis, J.D., et al., *Purification, sequence, and cellular localization of a novel chromosomal protein that binds to methylated DNA*. Cell, 1992. **69**(6): p. 905-14.
137. Hendrich, B. and A. Bird, *Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(11): p. 6538-47.
138. Laget, S., et al., *The human proteins MBD5 and MBD6 associate with heterochromatin but they do not bind methylated DNA*. PLoS One, 2010. **5**(8): p. e11982.
139. Baymaz, H.I., et al., *MBD5 and MBD6 interact with the human PR-DUB complex through their methyl-CpG-binding domain*. Proteomics, 2014. **14**(19): p. 2179-89.
140. Roloff, T.C., H.H. Ropers, and U.A. Nuber, *Comparative study of methyl-CpG-binding domain proteins*. BMC Genomics, 2003. **4**(1): p. 1.
141. Prokhortchouk, A., et al., *The p120 catenin partner Kaiso is a DNA methylation-dependent transcriptional repressor*. Genes Dev, 2001. **15**(13): p. 1613-8.
142. Daniel, J.M., et al., *The p120(ctn)-binding partner Kaiso is a bi-modal DNA-binding protein that recognizes both a sequence-specific consensus and methylated CpG dinucleotides*. Nucleic Acids Res, 2002. **30**(13): p. 2911-9.
143. Filion, G.J., et al., *A family of human zinc finger proteins that bind methylated DNA and repress transcription*. Mol Cell Biol, 2006. **26**(1): p. 169-81.
144. Sasai, N. and P.A. Defossez, *Many paths to one goal? The proteins that recognize methylated DNA in eukaryotes*. Int J Dev Biol, 2009. **53**(2-3): p. 323-34.
145. Sasai, N., M. Nakao, and P.A. Defossez, *Sequence-specific recognition of methylated DNA by human zinc-finger proteins*. Nucleic Acids Res, 2010. **38**(15): p. 5015-22.
146. Quenneville, S., et al., *In embryonic stem cells, ZFP57/KAP1 recognize a methylated hexanucleotide to affect chromatin and DNA methylation of imprinting control regions*. Mol Cell, 2011. **44**(3): p. 361-72.
147. Bostick, M., et al., *UHRF1 plays a role in maintaining DNA methylation in mammalian cells*. Science, 2007. **317**(5845): p. 1760-4.
148. Sharif, J., et al., *The SRA protein Np95 mediates epigenetic inheritance by recruiting Dnmt1 to methylated DNA*. Nature, 2007. **450**(7171): p. 908-12.
149. Hu, S., et al., *DNA methylation presents distinct binding sites for human transcription factors*. Elife, 2013. **2**: p. e00726.
150. Mellen, M., et al., *MeCP2 binds to 5hmC enriched within active genes and accessible chromatin in the nervous system*. Cell, 2012. **151**(7): p. 1417-30.

151. Zhou, T., et al., *Structural basis for hydroxymethylcytosine recognition by the SRA domain of UHRF2*. Mol Cell, 2014. **54**(5): p. 879-86.
152. Jones, P.L., et al., *Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription*. Nat Genet, 1998. **19**(2): p. 187-91.
153. Nan, X., et al., *Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex*. Nature, 1998. **393**(6683): p. 386-9.
154. Jones, P.A. and S.B. Baylin, *The epigenomics of cancer*. Cell, 2007. **128**(4): p. 683-92.
155. Zhang, Y., et al., *Analysis of the NuRD subunits reveals a histone deacetylase core complex and a connection with DNA methylation*. Genes Dev, 1999. **13**(15): p. 1924-35.
156. Harikrishnan, K.N., et al., *Brahma links the SWI/SNF chromatin-remodeling complex with MeCP2-dependent transcriptional silencing*. Nat Genet, 2005. **37**(3): p. 254-64.
157. Li, H., et al., *Molecular basis for site-specific read-out of histone H3K4me3 by the BPTF PHD finger of NURF*. Nature, 2006. **442**(7098): p. 91-5.
158. Wysocka, J., et al., *A PHD finger of NURF couples histone H3 lysine 4 trimethylation with chromatin remodelling*. Nature, 2006. **442**(7098): p. 86-90.
159. Mortusewicz, O., et al., *Recruitment of DNA methyltransferase I to DNA repair sites*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(25): p. 8905-9.
160. Cuozzo, C., et al., *DNA damage, homology-directed repair, and DNA methylation*. PLoS Genet, 2007. **3**(7): p. e110.
161. Costello, J.F., et al., *Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumour-type-specific patterns*. Nat Genet, 2000. **24**(2): p. 132-8.
162. Esteller, M., *Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps*. Nat Rev Genet, 2007. **8**(4): p. 286-98.
163. West, A.C. and R.W. Johnstone, *New and emerging HDAC inhibitors for cancer treatment*. J Clin Invest, 2014. **124**(1): p. 30-9.
164. Egger, G., et al., *Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy*. Nature, 2004. **429**(6990): p. 457-63.
165. Esteller, M., *Epigenetics in cancer*. N Engl J Med, 2008. **358**(11): p. 1148-59.
166. Dawson, M.A. and T. Kouzarides, *Cancer epigenetics: from mechanism to therapy*. Cell, 2012. **150**(1): p. 12-27.
167. Helin, K. and D. Dhanak, *Chromatin proteins and modifications as drug targets*. Nature, 2013. **502**(7472): p. 480-8.
168. Byrd, J.C., et al., *A phase I and pharmacodynamic study of depsipeptide (FK228) in chronic lymphocytic leukemia and acute myeloid leukemia*. Blood, 2005. **105**(3): p. 959-67.
169. O'Connor, O.A., et al., *Clinical experience with intravenous and oral formulations of the novel histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid in patients with advanced hematologic malignancies*. J Clin Oncol, 2006. **24**(1): p. 166-73.
170. Piekarz, R.L., et al., *Phase II multi-institutional trial of the histone deacetylase inhibitor romidepsin as monotherapy for patients with cutaneous T-cell lymphoma*. J Clin Oncol, 2009. **27**(32): p. 5410-7.
171. Garcia, J.S., N. Jain, and L.A. Godley, *An update on the safety and efficacy of decitabine in the treatment of myelodysplastic syndromes*. Onco Targets Ther, 2010. **3**: p. 1-13.
172. Luszczek, W., et al., *Combinations of DNA methyltransferase and histone deacetylase inhibitors induce DNA damage in small cell lung cancer cells: correlation of resistance with IFN-stimulated gene expression*. Mol Cancer Ther, 2010. **9**(8): p. 2309-21.

173. Bertino, E.M. and G.A. Otterson, *Romidepsin: a novel histone deacetylase inhibitor for cancer*. *Expert Opin Investig Drugs*, 2011. **20**(8): p. 1151-8.
174. Harrison, S.J., et al., *A focus on the preclinical development and clinical status of the histone deacetylase inhibitor, romidepsin (depsipeptide, Istodax((R)))*. *Epigenomics*, 2012. **4**(5): p. 571-89.
175. Poole, R.M., *Belinostat: first global approval*. *Drugs*, 2014. **74**(13): p. 1543-54.
176. Sawas, A., D. Radeski, and O.A. O'Connor, *Belinostat in patients with refractory or relapsed peripheral T-cell lymphoma: a perspective review*. *Ther Adv Hematol*, 2015. **6**(4): p. 202-8.
177. Fraga, M.F., et al., *Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer*. *Nat Genet*, 2005. **37**(4): p. 391-400.
178. Bosch-Presegue, L. and A. Vaquero, *Sirtuin-dependent epigenetic regulation in the maintenance of genome integrity*. *FEBS J*, 2015. **282**(9): p. 1745-67.
179. Nebbioso, A., et al., *Tumor-selective action of HDAC inhibitors involves TRAIL induction in acute myeloid leukemia cells*. *Nat Med*, 2005. **11**(1): p. 77-84.
180. Bolden, J.E., M.J. Peart, and R.W. Johnstone, *Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors*. *Nat Rev Drug Discov*, 2006. **5**(9): p. 769-84.
181. Lindemann, R.K., et al., *Analysis of the apoptotic and therapeutic activities of histone deacetylase inhibitors by using a mouse model of B cell lymphoma*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. **104**(19): p. 8071-6.
182. Leder, A. and P. Leder, *Butyric acid, a potent inducer of erythroid differentiation in cultured erythroleukemic cells*. *Cell*, 1975. **5**(3): p. 319-22.
183. Riggs, M.G., et al., *n-Butyrate causes histone modification in HeLa and Friend erythroleukaemia cells*. *Nature*, 1977. **268**(5619): p. 462-4.
184. Tarasenko, N., et al., *Histone deacetylase inhibitors: the anticancer, antimetastatic and antiangiogenic activities of AN-7 are superior to those of the clinically tested AN-9 (Pivanex)*. *Clin Exp Metastasis*, 2008. **25**(7): p. 703-16.
185. Keppler, B.R. and T.K. Archer, *Chromatin-modifying enzymes as therapeutic targets--Part 1*. *Expert Opin Ther Targets*, 2008. **12**(10): p. 1301-12.
186. Keppler, B.R. and T.K. Archer, *Chromatin-modifying enzymes as therapeutic targets--Part 2*. *Expert Opin Ther Targets*, 2008. **12**(11): p. 1457-67.
187. Lakshmaiah, K.C., et al., *Epigenetic therapy of cancer with histone deacetylase inhibitors*. *J Cancer Res Ther*, 2014. **10**(3): p. 469-78.
188. Gilbert, J., et al., *A phase I dose escalation and bioavailability study of oral sodium phenylbutyrate in patients with refractory solid tumor malignancies*. *Clin Cancer Res*, 2001. **7**(8): p. 2292-300.
189. Terao, Y., et al., *Sodium butyrate induces growth arrest and senescence-like phenotypes in gynecologic cancer cells*. *Int J Cancer*, 2001. **94**(2): p. 257-67.
190. Gottlicher, M., et al., *Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells*. *EMBO J*, 2001. **20**(24): p. 6969-78.
191. Doi, T., et al., *Evaluation of safety, pharmacokinetics, and efficacy of vorinostat, a histone deacetylase inhibitor, in the treatment of gastrointestinal (GI) cancer in a phase I clinical trial*. *Int J Clin Oncol*, 2013. **18**(1): p. 87-95.
192. Kirschbaum, M.H., et al., *A phase 2 study of belinostat (PXD101) in patients with relapsed or refractory acute myeloid leukemia or patients over the age of 60 with newly diagnosed acute myeloid leukemia: a California Cancer Consortium Study*. *Leuk Lymphoma*, 2014. **55**(10): p. 2301-4.
193. Itoh, Y., T. Suzuki, and N. Miyata, *Isoform-selective histone deacetylase inhibitors*. *Curr Pharm Des*, 2008. **14**(6): p. 529-44.

194. Kim, E.J., et al., *Clinically significant responses achieved with romidepsin across disease compartments in patients with cutaneous T-cell lymphoma*. *Leuk Lymphoma*, 2015; p. 1-8.
195. Robertson, K.D. and P.A. Jones, *DNA methylation: past, present and future directions*. *Carcinogenesis*, 2000. **21**(3): p. 461-7.
196. Kantarjian, H., et al., *Results of a randomized study of 3 schedules of low-dose decitabine in higher-risk myelodysplastic syndrome and chronic myelomonocytic leukemia*. *Blood*, 2007. **109**(1): p. 52-7.
197. Steensma, D.P., et al., *Multicenter study of decitabine administered daily for 5 days every 4 weeks to adults with myelodysplastic syndromes: the alternative dosing for outpatient treatment (ADOPT) trial*. *J Clin Oncol*, 2009. **27**(23): p. 3842-8.
198. Tsai, H.C., et al., *Transient low doses of DNA-demethylating agents exert durable antitumor effects on hematological and epithelial tumor cells*. *Cancer Cell*, 2012. **21**(3): p. 430-46.
199. Meldi, K., et al., *Specific molecular signatures predict decitabine response in chronic myelomonocytic leukemia*. *J Clin Invest*, 2015. **125**(5): p. 1857-72.
200. Juergens, R.A., et al., *Combination epigenetic therapy has efficacy in patients with refractory advanced non-small cell lung cancer*. *Cancer Discov*, 2011. **1**(7): p. 598-607.
201. Kirschbaum, M., et al., *A phase I clinical trial of vorinostat in combination with decitabine in patients with acute myeloid leukaemia or myelodysplastic syndrome*. *Br J Haematol*, 2014. **167**(2): p. 185-93.
202. Momparler, R.L., et al., *Epigenetic therapy of acute myeloid leukemia using 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine) in combination with inhibitors of histone methylation and deacetylation*. *Clin Epigenetics*, 2014. **6**(1): p. 19.
203. Beumer, J.H., et al., *Concentrations of the DNA methyltransferase inhibitor 5-fluoro-2'-deoxycytidine (FdCyd) and its cytotoxic metabolites in plasma of patients treated with FdCyd and tetrahydrouridine (THU)*. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2008. **62**(2): p. 363-8.
204. Newman, E.M., et al., *A phase I, pharmacokinetic, and pharmacodynamic evaluation of the DNA methyltransferase inhibitor 5-fluoro-2'-deoxycytidine, administered with tetrahydrouridine*. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2015. **75**(3): p. 537-46.
205. Fang, M.Z., et al., *Tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibits DNA methyltransferase and reactivates methylation-silenced genes in cancer cell lines*. *Cancer Res*, 2003. **63**(22): p. 7563-70.
206. Lee, B.H., et al., *Procainamide is a specific inhibitor of DNA methyltransferase 1*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(49): p. 40749-56.
207. Pandey, M., S. Shukla, and S. Gupta, *Promoter demethylation and chromatin remodeling by green tea polyphenols leads to re-expression of GSTP1 in human prostate cancer cells*. *Int J Cancer*, 2010. **126**(11): p. 2520-33.
208. Heltweg, B., et al., *Antitumor activity of a small-molecule inhibitor of human silent information regulator 2 enzymes*. *Cancer Res*, 2006. **66**(8): p. 4368-77.
209. Lara, E., et al., *Salermide, a Sirtuin inhibitor with a strong cancer-specific proapoptotic effect*. *Oncogene*, 2009. **28**(6): p. 781-91.
210. Lain, S., et al., *Discovery, in vivo activity, and mechanism of action of a small-molecule p53 activator*. *Cancer Cell*, 2008. **13**(5): p. 454-63.
211. Rodriguez-Paredes, M. and M. Esteller, *Cancer epigenetics reaches mainstream oncology*. *Nat Med*, 2011. **17**(3): p. 330-9.

212. Galluzzi, L., et al., *Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015*. Cell Death Differ, 2015. **22**(1): p. 58-73.
213. Ashkenazi, A., *Targeting the extrinsic apoptotic pathway in cancer: lessons learned and future directions*. J Clin Invest, 2015. **125**(2): p. 487-9.
214. Degterev, A., M. Boyce, and J. Yuan, *A decade of caspases*. Oncogene, 2003. **22**(53): p. 8543-67.
215. Juin, P., et al., *Decoding and unlocking the BCL-2 dependency of cancer cells*. Nat Rev Cancer, 2013. **13**(7): p. 455-65.
216. Cabon, L., A.C. Martinez-Torres, and S.A. Susin, *[Programmed cell death comes in many flavors]*. Med Sci (Paris), 2013. **29**(12): p. 1117-24.
217. Kumar, S., *Caspase function in programmed cell death*. Cell Death Differ, 2007. **14**(1): p. 32-43.
218. French, L.E. and J. Tschopp, *Protein-based therapeutic approaches targeting death receptors*. Cell Death Differ, 2003. **10**(1): p. 117-23.
219. Ashkenazi, A., *Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(6): p. 420-30.
220. Yeh, W.C., et al., *Requirement for Casper (c-FLIP) in regulation of death receptor-induced apoptosis and embryonic development*. Immunity, 2000. **12**(6): p. 633-42.
221. Altieri, D.C., *Survivin and IAP proteins in cell-death mechanisms*. Biochem J, 2010. **430**(2): p. 199-205.
222. Saelens, X., et al., *Toxic proteins released from mitochondria in cell death*. Oncogene, 2004. **23**(16): p. 2861-74.
223. Ouyang, L., et al., *Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis*. Cell Prolif, 2012. **45**(6): p. 487-98.
224. Borner, C., *The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions*. Mol Immunol, 2003. **39**(11): p. 615-47.
225. Igney, F.H. and P.H. Krammer, *Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(4): p. 277-88.
226. Favaloro, B., et al., *Role of apoptosis in disease*. Aging (Albany NY), 2012. **4**(5): p. 330-49.
227. Kerr, J.F., C.M. Winterford, and B.V. Harmon, *Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy*. Cancer, 1994. **73**(8): p. 2013-26.
228. Glinsky, G.V., et al., *Apoptosis and metastasis: increased apoptosis resistance of metastatic cancer cells is associated with the profound deficiency of apoptosis execution mechanisms*. Cancer Lett, 1997. **115**(2): p. 185-93.
229. Mehlen, P. and A. Puisieux, *Metastasis: a question of life or death*. Nat Rev Cancer, 2006. **6**(6): p. 449-58.
230. Evan, G. and T. Littlewood, *A matter of life and cell death*. Science, 1998. **281**(5381): p. 1317-22.
231. Martinez, R., et al., *CpG island promoter hypermethylation of the pro-apoptotic gene caspase-8 is a common hallmark of relapsed glioblastoma multiforme*. Carcinogenesis, 2007. **28**(6): p. 1264-8.
232. Chim, C.S., et al., *Epigenetic dysregulation of the death-associated protein kinase/p14/HDM2/p53/Apaf-1 apoptosis pathway in multiple myeloma*. J Clin Pathol, 2007. **60**(6): p. 664-9.
233. Martin, V., et al., *MBD2-mediated transcriptional repression of the p14ARF tumor suppressor gene in human colon cancer cells*. Pathobiology, 2008. **75**(5): p. 281-7.
234. Fulda, S., *Molecular pathways: targeting death receptors and smac mimetics*. Clin Cancer Res, 2014. **20**(15): p. 3915-20.

235. Rabizadeh, S., et al., *Induction of apoptosis by the low-affinity NGF receptor*. Science, 1993. **261**(5119): p. 345-8.
236. Yaar, M., et al., *Amyloid beta binds trimers as well as monomers of the 75-kDa neurotrophin receptor and activates receptor signaling*. J Biol Chem, 2002. **277**(10): p. 7720-5.
237. Mehlen, P., et al., *The DCC gene product induces apoptosis by a mechanism requiring receptor proteolysis*. Nature, 1998. **395**(6704): p. 801-4.
238. Mazelin, L., et al., *Netrin-1 controls colorectal tumorigenesis by regulating apoptosis*. Nature, 2004. **431**(7004): p. 80-4.
239. Castets, M., et al., *DCC constrains tumour progression via its dependence receptor activity*. Nature, 2012. **482**(7386): p. 534-7.
240. Llambi, F., et al., *Netrin-1 acts as a survival factor via its receptors UNC5H and DCC*. Embo J, 2001. **20**(11): p. 2715-22.
241. Wang, H., et al., *A newly identified dependence receptor UNC5H4 is induced during DNA damage-mediated apoptosis and transcriptional target of tumor suppressor p53*. Biochem Biophys Res Commun, 2008. **370**(4): p. 594-8.
242. Bordeaux, M.C., et al., *The RET proto-oncogene induces apoptosis: a novel mechanism for Hirschsprung disease*. EMBO J, 2000. **19**(15): p. 4056-63.
243. Yu, L.Y., et al., *GDNF-deprived sympathetic neurons die via a novel nonmitochondrial pathway*. J Cell Biol, 2003. **163**(5): p. 987-97.
244. Tulasne, D., et al., *Proapoptotic function of the MET tyrosine kinase receptor through caspase cleavage*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(23): p. 10328-39.
245. Montagne, R., et al., *[Thirty years of Met receptor research: from the discovery of an oncogene to the development of targeted therapies]*. Med Sci (Paris), 2014. **30**(10): p. 864-73.
246. Mourali, J., et al., *Anaplastic lymphoma kinase is a dependence receptor whose proapoptotic functions are activated by caspase cleavage*. Mol Cell Biol, 2006. **26**(16): p. 6209-22.
247. Tauszig-Delamasure, S., et al., *The TrkC receptor induces apoptosis when the dependence receptor notion meets the neurotrophin paradigm*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(33): p. 13361-6.
248. Ichim, G., S. Tauszig-Delamasure, and P. Mehlen, *Neurotrophins and cell death*. Exp Cell Res, 2012. **318**(11): p. 1221-8.
249. Nikolettou, V., et al., *Neurotrophin receptors TrkA and TrkC cause neuronal death whereas TrkB does not*. Nature, 2010. **467**(7311): p. 59-63.
250. Furne, C., et al., *EphrinB3 is an anti-apoptotic ligand that inhibits the dependence receptor functions of EphA4 receptors during adult neurogenesis*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1793**(2): p. 231-8.
251. Luchino, J., et al., *Semaphorin 3E suppresses tumor cell death triggered by the plexin D1 dependence receptor in metastatic breast cancers*. Cancer Cell, 2013. **24**(5): p. 673-85.
252. Boucher, J., et al., *A kinase-independent role for unoccupied insulin and IGF-1 receptors in the control of apoptosis*. Sci Signal, 2010. **3**(151): p. ra87.
253. Ellerby, L.M., et al., *Kennedy's disease: caspase cleavage of the androgen receptor is a crucial event in cytotoxicity*. J Neurochem, 1999. **72**(1): p. 185-95.
254. LaFevre-Bernt, M.A. and L.M. Ellerby, *Kennedy's disease. Phosphorylation of the polyglutamine-expanded form of androgen receptor regulates its cleavage by caspase-3 and enhances cell death*. J Biol Chem, 2003. **278**(37): p. 34918-24.

255. Stupack, D.G., *Integrins as a distinct subtype of dependence receptors*. Cell Death Differ, 2005. **12**(8): p. 1021-30.
256. Fombonne, J., et al., *Patched dependence receptor triggers apoptosis through ubiquitination of caspase-9*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(26): p. 10510-5.
257. Delloye-Bourgeois, C., et al., *Sonic Hedgehog promotes tumor cell survival by inhibiting CDON pro-apoptotic activity*. PLoS Biol, 2013. **11**(8): p. e1001623.
258. Chen, X.L., et al., *Patched-1 proapoptotic activity is downregulated by modification of K1413 by the E3 ubiquitin-protein ligase Itchy homolog*. Mol Cell Biol, 2014. **34**(20): p. 3855-66.
259. Gibert, B., et al., *Regulation by miR181 family of the dependence receptor CDON tumor suppressive activity in neuroblastoma*. J Natl Cancer Inst, 2014. **106**(11).
260. Matsunaga, E., et al., *RGM and its receptor neogenin regulate neuronal survival*. Nat Cell Biol, 2004. **6**(8): p. 749-55.
261. Maise, C., et al., *Lipid raft localization and palmitoylation: identification of two requirements for cell death induction by the tumor suppressors UNC5H*. Exp Cell Res, 2008. **314**(14): p. 2544-52.
262. Hedgecock, E.M., J.G. Culotti, and D.H. Hall, *The unc-5, unc-6, and unc-40 genes guide circumferential migrations of pioneer axons and mesodermal cells on the epidermis in C. elegans*. Neuron, 1990. **4**(1): p. 61-85.
263. Kennedy, T.E., et al., *Axon guidance by diffusible chemoattractants: a gradient of netrin protein in the developing spinal cord*. J Neurosci, 2006. **26**(34): p. 8866-74.
264. Kennedy, T.E., et al., *Netrins are diffusible chemotropic factors for commissural axons in the embryonic spinal cord*. Cell, 1994. **78**(3): p. 425-35.
265. Hamasaki, T., et al., *A role of netrin-1 in the formation of the subcortical structure striatum: repulsive action on the migration of late-born striatal neurons*. J Neurosci, 2001. **21**(12): p. 4272-80.
266. Cirulli, V. and M. Yebra, *Netrins: beyond the brain*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(4): p. 296-306.
267. Serafini, T., et al., *Netrin-1 is required for commissural axon guidance in the developing vertebrate nervous system*. Cell, 1996. **87**(6): p. 1001-14.
268. Meyerhardt, J.A., et al., *Netrin-1: interaction with deleted in colorectal cancer (DCC) and alterations in brain tumors and neuroblastomas*. Cell Growth Differ, 1999. **10**(1): p. 35-42.
269. Kolodziej, P.A., et al., *frazzled encodes a Drosophila member of the DCC immunoglobulin subfamily and is required for CNS and motor axon guidance*. Cell, 1996. **87**(2): p. 197-204.
270. Geisbrecht, B.V., et al., *Netrin binds discrete subdomains of DCC and UNC5 and mediates interactions between DCC and heparin*. J Biol Chem, 2003. **278**(35): p. 32561-8.
271. Kruger, R.P., et al., *Mapping netrin receptor binding reveals domains of Unc5 regulating its tyrosine phosphorylation*. J Neurosci, 2004. **24**(48): p. 10826-34.
272. Barallobre, M.J., et al., *The Netrin family of guidance factors: emphasis on Netrin-1 signalling*. Brain Res Brain Res Rev, 2005. **49**(1): p. 22-47.
273. Wang, R., et al., *Autoinhibition of UNC5b revealed by the cytoplasmic domain structure of the receptor*. Mol Cell, 2009. **33**(6): p. 692-703.
274. Leonardo, E.D., et al., *Vertebrate homologues of C. elegans UNC-5 are candidate netrin receptors*. Nature, 1997. **386**(6627): p. 833-8.
275. Takemoto, M., et al., *Laminar and areal expression of unc5d and its role in cortical cell survival*. Cereb Cortex, 2011. **21**(8): p. 1925-34.

276. Thiebault, K., et al., *The netrin-1 receptors UNC5H are putative tumor suppressors controlling cell death commitment*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(7): p. 4173-8.
277. Mille, F., et al., *Interfering with multimerization of netrin-1 receptors triggers tumor cell death*. Cell Death Differ, 2009. **16**(10): p. 1344-51.
278. Llambi, F., et al., *The dependence receptor UNC5H2 mediates apoptosis through DAP-kinase*. EMBO J, 2005. **24**(6): p. 1192-201.
279. Cohen, O., et al., *DAP-kinase participates in TNF-alpha- and Fas-induced apoptosis and its function requires the death domain*. J Cell Biol, 1999. **146**(1): p. 141-8.
280. Guenebeaud, C., et al., *The dependence receptor UNC5H2/B triggers apoptosis via PP2A-mediated dephosphorylation of DAP kinase*. Mol Cell, 2010. **40**(6): p. 863-76.
281. Bagri, A. and A. Ashkenazi, *UNCovering the molecular machinery of dependence receptor signaling*. Mol Cell, 2010. **40**(6): p. 851-3.
282. Arakawa, H., *Netrin-1 and its receptors in tumorigenesis*. Nat Rev Cancer, 2004. **4**(12): p. 978-87.
283. Tanikawa, C., et al., *p53RDL1 regulates p53-dependent apoptosis*. Nat Cell Biol, 2003. **5**(3): p. 216-23.
284. Ogawara, Y., et al., *Akt enhances Mdm2-mediated ubiquitination and degradation of p53*. J Biol Chem, 2002. **277**(24): p. 21843-50.
285. He, K., et al., *Akt-phosphorylated PIKE-A inhibits UNC5B-induced apoptosis in cancer cell lines in a p53-dependent manner*. Mol Biol Cell, 2011. **22**(11): p. 1943-54.
286. Paradisi, A., et al., *Combining chemotherapeutic agents and netrin-1 interference potentiates cancer cell death*. EMBO Mol Med, 2013. **5**(12): p. 1821-34.
287. Bernet, A., et al., *Inactivation of the UNC5C Netrin-1 receptor is associated with tumor progression in colorectal malignancies*. Gastroenterology, 2007. **133**(6): p. 1840-8.
288. Delloye-Bourgeois, C., et al., *Interference with netrin-1 and tumor cell death in non-small cell lung cancer*. J Natl Cancer Inst, 2009. **101**(4): p. 237-47.
289. Delloye-Bourgeois, C., et al., *Netrin-1 acts as a survival factor for aggressive neuroblastoma*. J Exp Med, 2009. **206**(4): p. 833-47.
290. Fitamant, J., et al., *Netrin-1 expression confers a selective advantage for tumor cell survival in metastatic breast cancer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(12): p. 4850-5.
291. Harter, P.N., et al., *Netrin-1 expression is an independent prognostic factor for poor patient survival in brain metastases*. PLoS One, 2014. **9**(3): p. e92311.
292. Latil, A., et al., *Quantification of expression of netrins, slits and their receptors in human prostate tumors*. Int J Cancer, 2003. **103**(3): p. 306-15.
293. Zhang, L., et al., *Genome-wide analysis of histone H3 lysine 27 trimethylation by ChIP-chip in gastric cancer patients*. J Gastroenterol, 2009. **44**(4): p. 305-12.
294. Inbal, B., et al., *DAP kinase links the control of apoptosis to metastasis*. Nature, 1997. **390**(6656): p. 180-4.
295. Michie, A.M., et al., *Death-associated protein kinase (DAPK) and signal transduction: regulation in cancer*. FEBS J, 2010. **277**(1): p. 74-80.
296. Chen, H.Y., Y.R. Lee, and R.H. Chen, *The functions and regulations of DAPK in cancer metastasis*. Apoptosis, 2014. **19**(2): p. 364-70.
297. Khanna, A., J.E. Pimanda, and J. Westermarck, *Cancerous inhibitor of protein phosphatase 2A, an emerging human oncoprotein and a potential cancer therapy target*. Cancer Res, 2013. **73**(22): p. 6548-53.

298. Seshacharyulu, P., et al., *Phosphatase: PP2A structural importance, regulation and its aberrant expression in cancer*. *Cancer Lett*, 2013. **335**(1): p. 9-18.
299. Arakawa, H., *p53, apoptosis and axon-guidance molecules*. *Cell Death Differ*, 2005. **12**(8): p. 1057-65.
300. Duffy, M.J., et al., *p53 as a target for the treatment of cancer*. *Cancer Treat Rev*, 2014. **40**(10): p. 1153-60.
301. Paradisi, A., et al., *NF-kappaB regulates netrin-1 expression and affects the conditional tumor suppressive activity of the netrin-1 receptors*. *Gastroenterology*, 2008. **135**(4): p. 1248-57.
302. Serafini, T., et al., *The netrins define a family of axon outgrowth-promoting proteins homologous to C. elegans UNC-6*. *Cell*, 1994. **78**(3): p. 409-24.
303. Mehlen, P., C. Delloye-Bourgeois, and A. Chedotal, *Novel roles for Slits and netrins: axon guidance cues as anticancer targets?* *Nat Rev Cancer*, 2011. **11**(3): p. 188-97.
304. van Gils, J.M., et al., *The neuroimmune guidance cue netrin-1 promotes atherosclerosis by inhibiting the emigration of macrophages from plaques*. *Nat Immunol*, 2012. **13**(2): p. 136-43.
305. Bongo, J.B. and D.Q. Peng, *The neuroimmune guidance cue netrin-1: a new therapeutic target in cardiovascular disease*. *J Cardiol*, 2014. **63**(2): p. 95-8.
306. Ramkhalawon, B., et al., *Netrin-1 promotes adipose tissue macrophage retention and insulin resistance in obesity*. *Nat Med*, 2014. **20**(4): p. 377-84.
307. Forcet, C., et al., *Netrin-1-mediated axon outgrowth requires deleted in colorectal cancer-dependent MAPK activation*. *Nature*, 2002. **417**(6887): p. 443-7.
308. Ming, G., et al., *Phospholipase C-gamma and phosphoinositide 3-kinase mediate cytoplasmic signaling in nerve growth cone guidance*. *Neuron*, 1999. **23**(1): p. 139-48.
309. Goldschneider, D. and P. Mehlen, *Dependence receptors: a new paradigm in cell signaling and cancer therapy*. *Oncogene*, 2010. **29**(13): p. 1865-82.
310. Winberg, M.L., K.J. Mitchell, and C.S. Goodman, *Genetic analysis of the mechanisms controlling target selection: complementary and combinatorial functions of netrins, semaphorins, and IgCAMs*. *Cell*, 1998. **93**(4): p. 581-91.
311. Wang, H., et al., *Netrin-3, a mouse homolog of human NTN2L, is highly expressed in sensory ganglia and shows differential binding to netrin receptors*. *J Neurosci*, 1999. **19**(12): p. 4938-47.
312. Finci, L.I., et al., *The crystal structure of netrin-1 in complex with DCC reveals the bifunctionality of netrin-1 as a guidance cue*. *Neuron*, 2014. **83**(4): p. 839-49.
313. Xu, K., et al., *Neural migration. Structures of netrin-1 bound to two receptors provide insight into its axon guidance mechanism*. *Science*, 2014. **344**(6189): p. 1275-9.
314. Brasch, J., et al., *Crystal structure of the ligand binding domain of netrin G2*. *J Mol Biol*, 2011. **414**(5): p. 723-34.
315. Hussain, S.A., F. Carafoli, and E. Hohenester, *Determinants of laminin polymerization revealed by the structure of the alpha5 chain amino-terminal region*. *EMBO Rep*, 2011. **12**(3): p. 276-82.
316. Stetefeld, J., et al., *Crystal structure of three consecutive laminin-type epidermal growth factor-like (LE) modules of laminin gamma1 chain harboring the nidogen binding site*. *J Mol Biol*, 1996. **257**(3): p. 644-57.
317. Koch, M., et al., *A novel member of the netrin family, beta-netrin, shares homology with the beta chain of laminin: identification, expression, and functional characterization*. *J Cell Biol*, 2000. **151**(2): p. 221-34.

318. Yurchenco, P.D. and W.G. Wadsworth, *Assembly and tissue functions of early embryonic laminins and netrins*. *Curr Opin Cell Biol*, 2004. **16**(5): p. 572-9.
319. Lim, Y.S. and W.G. Wadsworth, *Identification of domains of netrin UNC-6 that mediate attractive and repulsive guidance and responses from cells and growth cones*. *J Neurosci*, 2002. **22**(16): p. 7080-7.
320. Raval, A., et al., *Downregulation of death-associated protein kinase 1 (DAPK1) in chronic lymphocytic leukemia*. *Cell*, 2007. **129**(5): p. 879-90.
321. Evans, P., *Scaling and assessment of data quality*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2006. **62**(Pt 1): p. 72-82.
322. *The CCP4 suite: programs for protein crystallography*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 1994. **50**(Pt 5): p. 760-3.
323. Strong, M., et al., *Toward the structural genomics of complexes: crystal structure of a PE/PPE protein complex from Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. **103**(21): p. 8060-5.
324. McCoy, A.J., et al., *Phaser crystallographic software*. *J Appl Crystallogr*, 2007. **40**(Pt 4): p. 658-674.
325. Murshudov, G.N., et al., *REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2011. **67**(Pt 4): p. 355-67.
326. Laskowsky, R.A., MacArthur, M. W., Moss, D. S. & Thornton, J. M., *PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures*. *J. Appl. Cryst*, 1993. **26**: p. 283-291.
327. Gasteiger, E., et al., *ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis*. *Nucleic Acids Res*, 2003. **31**(13): p. 3784-8.
328. Lutteke, T. and C.W. von der Lieth, *pdb-care (PDB carbohydrate residue check): a program to support annotation of complex carbohydrate structures in PDB files*. *BMC Bioinformatics*, 2004. **5**: p. 69.
329. Lutteke, T., M. Frank, and C.W. von der Lieth, *Carbohydrate Structure Suite (CSS): analysis of carbohydrate 3D structures derived from the PDB*. *Nucleic Acids Res*, 2005. **33**(Database issue): p. D242-6.
330. Lutteke, T., et al., *GLYCOSCIENCES.de: an Internet portal to support glycomics and glycobiology research*. *Glycobiology*, 2006. **16**(5): p. 71R-81R.
331. Baker, N.A., et al., *Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(18): p. 10037-41.
332. Camacho, C.J. and C. Zhang, *FastContact: rapid estimate of contact and binding free energies*. *Bioinformatics*, 2005. **21**(10): p. 2534-6.
333. Krissinel, E. and K. Henrick, *Inference of macromolecular assemblies from crystalline state*. *J Mol Biol*, 2007. **372**(3): p. 774-97.
334. Corpet, F., *Multiple sequence alignment with hierarchical clustering*. *Nucleic Acids Res*, 1988. **16**(22): p. 10881-90.
335. Gouet, P., et al., *ESPrpt: analysis of multiple sequence alignments in PostScript*. *Bioinformatics*, 1999. **15**(4): p. 305-8.
336. Mehlen, P. and C. Guenebeaud, *Netrin-1 and its dependence receptors as original targets for cancer therapy*. *Curr Opin Oncol*, 2010. **22**(1): p. 46-54.
337. Krimpenfort, P., et al., *Deleted in colorectal carcinoma suppresses metastasis in p53-deficient mammary tumours*. *Nature*, 2012. **482**(7386): p. 538-41.
338. Hedrick, L., et al., *The DCC gene product in cellular differentiation and colorectal tumorigenesis*. *Genes Dev*, 1994. **8**(10): p. 1174-83.
339. Shin, S.K., et al., *Epigenetic and genetic alterations in Netrin-1 receptors UNC5C and DCC in human colon cancer*. *Gastroenterology*, 2007. **133**(6): p. 1849-57.

340. Grandin, M., Meier, M, Delcros, JG, Nikodemus, D, Reuten, R, Patel, TR, Goldschneider, D, Orriss, G, Krahn, N, Boussouar, A, Abes, R, Dean, Y, Neves, D, Bernet, A, Depil, S, Schneiders, F, Poole, K, Dante, R, Koch, M, Mehlen, P, and Stetefeld, J., *Structural decoding of the Netrin-1-UNC5 interaction and its therapeutic implications in cancers*. Cancer Cell, In press, 2015.
341. Mian, O.Y., et al., *Methyl-binding domain protein 2-dependent proliferation and survival of breast cancer cells*. Mol Cancer Res, 2011. **9**(8): p. 1152-62.
342. Baylin, S.B. and J.E. Ohm, *Epigenetic gene silencing in cancer - a mechanism for early oncogenic pathway addiction?* Nat Rev Cancer, 2006. **6**(2): p. 107-16.
343. Pulling, L.C., et al., *Dual promoter regulation of death-associated protein kinase gene leads to differentially silenced transcripts by methylation in cancer*. Carcinogenesis, 2009. **30**(12): p. 2023-30.
344. Kilinc, D., et al., *Alterations in promoter methylation status of tumor suppressor HIC1, SFRP2, and DAPK1 genes in prostate carcinomas*. DNA Cell Biol, 2012. **31**(5): p. 826-32.
345. Tang, X., et al., *Hypermethylation of the death-associated protein kinase promoter attenuates the sensitivity to TRAIL-induced apoptosis in human non-small cell lung cancer cells*. Mol Cancer Res, 2004. **2**(12): p. 685-91.
346. Yang, X., et al., *Targeting DNA methylation for epigenetic therapy*. Trends Pharmacol Sci, 2010. **31**(11): p. 536-46.
347. Rodriguez-Paredes, M. and M. Esteller, *A combined epigenetic therapy equals the efficacy of conventional chemotherapy in refractory advanced non-small cell lung cancer*. Cancer Discov, 2011. **1**(7): p. 557-9.
348. Dulaimi, E., et al., *Tumor suppressor gene promoter hypermethylation in serum of breast cancer patients*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(18 Pt 1): p. 6189-93.
349. Kissil, J.L., et al., *DAP-kinase loss of expression in various carcinoma and B-cell lymphoma cell lines: possible implications for role as tumor suppressor gene*. Oncogene, 1997. **15**(4): p. 403-7.
350. Elenbaas, B., et al., *Human breast cancer cells generated by oncogenic transformation of primary mammary epithelial cells*. Genes Dev, 2001. **15**(1): p. 50-65.
351. Morel, A.P., et al., *Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition*. PLoS One, 2008. **3**(8): p. e2888.
352. Lund, P., et al., *Transformation-dependent silencing of tumor-selective apoptosis-inducing TRAIL by DNA hypermethylation is antagonized by decitabine*. Mol Cancer Ther, 2011. **10**(9): p. 1611-23.
353. Wang, J., et al., *WEB-based GENE SeT AnaLysis Toolkit (WebGestalt): update 2013*. Nucleic Acids Res, 2013. **41**(Web Server issue): p. W77-83.
354. Zhu, Y., et al., *Dependence receptor UNC5D mediates nerve growth factor depletion-induced neuroblastoma regression*. J Clin Invest, 2013. **123**(7): p. 2935-47.
355. Azad, N., et al., *The future of epigenetic therapy in solid tumours--lessons from the past*. Nat Rev Clin Oncol, 2013. **10**(5): p. 256-66.
356. Yang, D., et al., *Decitabine and vorinostat cooperate to sensitize colon carcinoma cells to Fas ligand-induced apoptosis in vitro and tumor suppression in vivo*. J Immunol, 2012. **188**(9): p. 4441-9.
357. Beygo, J., et al., *The molecular function and clinical phenotype of partial deletions of the IGF2/H19 imprinting control region depends on the spatial arrangement of the remaining CTCF-binding sites*. Hum Mol Genet, 2013. **22**(3): p. 544-57.
358. Kim, D., et al., *TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions*. Genome Biol, 2013. **14**(4): p. R36.

359. Subramanian, A., et al., *Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(43): p. 15545-50.
360. Genevois, A.L., et al., *Dependence receptor TrkC is a putative colon cancer tumor suppressor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(8): p. 3017-22.
361. Ahmed, I.A., et al., *Epigenetic alterations by methylation of RASSF1A and DAPK1 promoter sequences in mammary carcinoma detected in extracellular tumor DNA*. Cancer Genet Cytogenet, 2010. **199**(2): p. 96-100.
362. Fujita, Y., et al., *Neogenin regulates neuronal survival through DAP kinase*. Cell Death Differ, 2008. **15**(10): p. 1593-608.
363. Waterhouse, N.J., et al., *Calpain activation is upstream of caspases in radiation-induced apoptosis*. Cell Death Differ, 1998. **5**(12): p. 1051-61.
364. Abraham, M.C. and S. Shaham, *Death without caspases, caspases without death*. Trends Cell Biol, 2004. **14**(4): p. 184-93.
365. Inbal, B., et al., *DAP kinase and DRP-1 mediate membrane blebbing and the formation of autophagic vesicles during programmed cell death*. J Cell Biol, 2002. **157**(3): p. 455-68.
366. Goldschneider, D., et al., *The neogenin intracellular domain regulates gene transcription via nuclear translocation*. Mol Cell Biol, 2008. **28**(12): p. 4068-79.
367. Zhao, J., et al., *Death-associated protein kinase 1 promotes growth of p53-mutant cancers*. J Clin Invest, 2015. **125**(7): p. 2707-20.
368. Kiely, M. and P.A. Kiely, *PP2A: The Wolf in Sheep's Clothing?* Cancers (Basel), 2015. **7**(2): p. 648-69.
369. Matsunaga, E., H. Nakamura, and A. Chedotal, *Repulsive guidance molecule plays multiple roles in neuronal differentiation and axon guidance*. J Neurosci, 2006. **26**(22): p. 6082-8.
370. Stresemann, C. and F. Lyko, *Modes of action of the DNA methyltransferase inhibitors azacytidine and decitabine*. Int J Cancer, 2008. **123**(1): p. 8-13.
371. Nidal E. Muvarak¹, C.R., Pratik K. Nagaria¹, Khadiza Chowdhury¹, Eun Yong Choi¹, Vu Duong¹, Ashkan Emadi¹, Maria R. Baer¹, Rena Lapidus¹, Stephen Baylin², and Feyruz Rassool¹, *Combination of DNA methyltransferase and PARP inhibitors as a novel therapy strategy for poor prognosis acute myeloid leukemia*. Abstract 2848 presented during AACR meeting, 2015.
372. Paradisi, A., et al., *Netrin-1 up-regulation in inflammatory bowel diseases is required for colorectal cancer progression*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(40): p. 17146-51.
373. Ramesh, G., A. Berg, and C. Jayakumar, *Plasma netrin-1 is a diagnostic biomarker of human cancers*. Biomarkers, 2011. **16**(2): p. 172-80.