Identification des évènements génétiques impliqués dans la transformation maligne de la neurofibromatose de type 1

Armelle Luscan

▶ **To cite this version:**

Armelle Luscan. Identification des évènements génétiques impliqués dans la transformation maligne de la neurofibromatose de type 1. Génétique. Université Sorbonne Paris Cité, 2016. Français. NNT : 2016USPCB050 . tel-01734501

HAL Id: tel-01734501
https://theses.hal.science/tel-01734501

Submitted on 14 Mar 2018

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.

Université Paris Descartes

Ecole doctorale BioSPC

UFR de Pharmacie
EA 7331 Génétique, physiopathologie et approches thérapeutiques des maladies héréditaires du système nerveux
4 avenue de l'observatoire
75006 PARIS

Institut Curie- Unité de Génétique et de Biologie du Développement
UMR 3215 CNRS / U934 Inserm
11-13 Rue Pierre et Marie Curie
75005- Paris

Identification des évènements génétiques impliqués dans la transformation maligne de la neurofibromatose de type 1

Par Armelle LUSCAN

Thèse de doctorat de Génétique ; Département DGNRV

Dirigée par Michel VIDAUD et Raphaël MARGUERON

Présentée et soutenue publiquement le lundi 3 octobre 2016

Devant un jury composé de :

Olivier BERNARD, DR - **Rapporteur**

Thierry FREBOURG, PU-PH - **Rapporteur**

Marc-Henri STERN, DR

Pierre WOLKENSTEIN, PU-PH

Résumé (français) :
La neurofibromatose de type 1 (NF1) est un syndrome de prédisposition tumorale causée par une mutation perte-de-fonction du gène suppresseur de tumeurs *NF1*. Près de la moitié des patients atteints de NF1 développent un type de tumeurs bénignes des gaines des nerfs périphériques appelés neurofibromes plexiformes. Ces tumeurs sont majoritairement constituées de cellules de Schwann présentant une inactivation somatique du deuxième allèle *NF1*. Les neurofibromes plexiformes peuvent se transformer en tumeurs malignes dénommées MPNST **(***Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumor*) qui sont des sarcomes extrêmement agressifs, résistants aux thérapies actuelles et représentant la première cause de mortalité des patients NF1. A ce jour, les acteurs à l'origine de cette transformation maligne ne sont pas clairement établis. Leur identification représente donc un enjeu majeur pour une prise en charge appropriée des patients et le développement de nouvelles molécules thérapeutiques. Dans ce contexte, le travail mené au cours de ma thèse a eu pour objectifs la recherche et la caractérisation de nouvelles voies de signalisations impliquées dans la tumorigenèse NF1. D'une part, une approche orientée par les travaux antérieurs au laboratoire a permis de montrer l'implication de la voie WNT dans la tumorigenèse NF1. D'autre part, une approche génomique plus large a conduit à la mise en évidence de l'inactivation du répresseur transcriptionnel PRC2 (*Polycomb Repressive Complex 2*) dans près de la moitié des MPNST. La génération de modèles cellulaires *in vitro* a facilité l'exploration des gènes surexprimés lors de la perte de fonction du PRC2. Elle a également permis d'entreprendre un crible lentiCRISPR pan-génomique à la recherche des gènes essentiels à la survie des cellules tumorales mutées pour le PRC2.

Title : Identification of genetics events involved in malignant transformation in neurofibromatosis type 1

Abstract :
Neurofibromatosis type 1 (NF1) is a tumor predisposition syndrome caused by loss-of-function mutations in the NF1 tumor suppressor gene. Almost half of NF1 patients develop a specific type of benign peripheral nerve sheath tumor called plexiform neurofibromas. These tumors are mainly composed of Schwann cells in which the second NF1 allele is inactivated. Plexiform neurofibromas can give rise to malignant tumors called MPNST that are extremely aggressive sarcomas, resistant to therapy and which represents the first cause of early demise of NF1 patients. The molecular mechanisms underlying this malignant transformation remain enigmatic. Their identification is crucial for appropriate management of NF1 patients and development of new therapies. The goal of my PhD was to identify and characterize new signaling pathways involved in NF1 tumorigenesis. On the one hand, we highlighted the involvement of WNT pathway in NF1 tumorigenesis. On the other hand, a larger genomic approach led to the identification of the transcriptional repressor PRC2 (Polycomb Repressive Complex 2) inactivation in almost half of MPNST. We have generated various cell models, which facilitated the exploration of genes aberrantly expressed consequently to PRC2 loss-of-function. These models also allowed performing a pan-genomic lentiCRISPR screen searching for essential genes for PRC2-mutated tumor cells survival.

Mots clés (français) : Neurofibromatose de type 1, MPNST, PRC2
Keywords : Neurofibromatosis type 1, MPNST, PRC2

REMERCIEMENTS

Au Professeur Michel Vidaud et au Docteur Raphaël Margueron,

Vous me faites l'honneur de présider cette thèse mais vous avez fait bien plus pour moi!

Michel, depuis ma deuxième année de pharmacie, vous m'avez accompagnée sur les voies de la génétique, de l'hôpital et de la recherche. Vous m'avez accueillie avec beaucoup de bienveillance au sein de votre laboratoire, m'avez fait confiance pour prendre part à plusieurs projets et m'avez soutenue durant mon parcours. Vous m'avez même obtenue un poste!

Raphaël, tu m'as accueillie dans ton équipe en deuxième partie de thèse pour que je poursuive mes travaux, entourée des personnes les plus compétentes dans le domaine du PRC2. Grâce à toi, j'ai pu découvrir un environnement de recherche extraordinaire, une émulation scientifique hors-pair et les exigences de la recherche.

Pour tout cela, soyez assurés, tous deux, de mon profond respect et de ma sincère reconnaissance...

Au Professeur Thierry Frebourg, à Olivier Bernard, au Professeur Pierre Wolkenstein, à Marc-Henri Stern,

Vous me faites l'honneur d'être membres du Jury de cette thèse; veuillez recevoir ma très respectueuse considération.

Au Docteur Eric Pasmant,

A toi aussi je dois tellement! Tu as été mon modèle tout au long de mon parcours. Je n'en finirai jamais de te remercier !!! Pour ton encadrement au quotidien, la transmission de tes connaissances, ta disponibilité et ta gentillesse… la liste est longue ! Un merci de plus pour m'avoir guidée et encadrée dans ce projet (et dans tous les autres !), jusque dans la rédaction du manuscrit. C'est un immense plaisir que de travailler à tes côtés ! A toi maintenant de découvrir Curie et tous ces trésors. A mon tour, je vais peut-être pouvoir t'aider!!

Au Docteur Michel Wassef,

Encore une personne exceptionnelle que je dois remercier! Heureusement que tu étais là pour m'épauler au quotidien sur ce projet à Curie! C'est simple, tu m'as tout appris. A la paillasse, en culture, aux séminaires, pour la lecture critique d'articles: je t'ai énormément sollicité mais tu as fais preuve d'une patience et d'une pédagogie exemplaires. J'ai une immense admiration pour ta curiosité et ton exigence scientifique ainsi que tes milles idées à la seconde. Avec toi, j'ai découvert ce qu'est LA recherche! Un grand merci pour tout.

A toute l'équipe du laboratoire de la Faculté de Pharmacie,

C'est auprès de vous que j'ai fait mes premiers pas en génétique. Travailler au sein de votre équipe a été source d'enrichissement et d'épanouissement. Merci à :

Ingrid, pour le savoir de laboratoire que tu m'as transmis mais surtout pour ta gentillesse et ta disponibilité,

Ivan pour tes conseils qui sont toujours avisés,

Jennifer, pour tes connaissances techniques et l'aide que tu m'as apportée depuis mon arrivée au labo,

Béatrice, pour ta grande pédagogie et la rigueur que tu m'as inculquée,

Dominique, pour ton attention et ta bienveillance à mon égard.

Et merci aussi à Delphine, Assina, Lyria et Séverine pour les moments de détente et partages.

A l'équipe de la team Margueron,

A Roberta, la tornade italienne. Avec toi, ma Roby, ça déménage! Merci pour ton dynamisme et ton soutien au quotidien. Courage pour ta dernière année de thésarde bien trempée!

A Aude, quels bons moments passés en pièce de culture avec toi! Nous y avons refait le monde, voyagé (en pensée), tellement rigolé et aussi beaucoup travaillé! Merci pour ton smile permanent!

A Audrey, tu es une fille géniale qui gère le labo d'une main de maitre, avec une franchise et une droiture rares. J'ai beaucoup d'admiration pour toi!

A Carole, Joey, Marion : j'ai eu de la chance de vous avoir avec moi pour m'aider sur le projet. A chacune de vos arrivées, un nouveau dynamisme m'était insufflé.

A Antoine, Stéphanie, Mattia, Daniel, Hong, Manu qui sont/ont été les autres membres de cette équipe de grande qualité. J'ai beaucoup appris à vos cotés!

Et aux membres de la BDD particulièrement the third floor,

Pour les échanges scientifiques, sportifs ou festifs! Malgré mon anglais, un peu galère, j'ai découvert à la BDD, un ensemble de personnes incroyables qui m'ont ouvert de nouveaux horizons!

A toute l'équipe du laboratoire de Biologie Moléculaire de l'Hôpital Cochin,

Merci en particulier à la chaleureuse et dynamique Team NGS et tous ses Ion-potes : Phiphi et Chrystel pour vos conseils et votre bonne humeur, Audrey pour ton aide dans les analyses bio-info et ton amitié. Aux techniciens et techniciennes, merci pour votre aide et disponibilité à chaque fois que je vous ai sollicités.

Aux autres belles rencontres hospitalières, aux cointernes de génét' : merci pour ces instants de partage d'expériences et de soutien précieux. Un merci particulier à Cyrillus et Sophie. Y a pas à dire, on a fait la plus belle spécialité!

A tous mes copaings

A ceux de l'internat, avec, bien sûr, une mention spéciale pour les meuffettes : Evounette, Stéphou et Tiphounette pour ces ouf moments passés ensemble tout au long de l'internat. On s'est sacrément bien régalé! Même au bout du scotch, quand tout le monde nous court sur le haricot, vous restez les plus « ounettes »! Que notre amitié se poursuive encore longtemps... A Anne-So et Delphine, parce que vous êtes géniales!

Avec comme dans les ronéos d'autrefois, une spéciale Kacedédi ici au groupe de pharma : Blandine, Clém, Marie, Aurélie, Erwanne, Soiz, Xav et Armellita. J'ai eu beaucoup de chance de vous avoir rencontrés. C'est aussi grâce à vous si j'ai passé d'aussi bonnes années d'étude. J'ai d'ailleurs mis bien du temps à les clôturer... Et oui, après 12 ans d'étude, la carte étudiante, ça va être enfin fini!!

A tous les « non-scientifiques » qu'il est si bon de retrouver après des journées bien chargées. Bien que vous n'ayez pas directement contribué à ce travail, vous méritez une mention particulière pour l'aide et le soutien que vous m'apportez au quotidien.

A ma famille nombreuse,

Merci pour votre indéfectible soutien tout au long de ses longues années d'étude. Sans vous, je n'en serais pas là aujourd'hui. Je vous adore!!

A mon Bruno superman,
Tellement extraordinaire…
Tu supportes au quotidien cette femme passionnée et impliquée dans son travail que je suis! Tu m'apportes équilibre, soutien et tellement plus…

Merci.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS 3

TABLE DES MATIERES 6

TABLE DES ILLUSTRATIONS 9

TABLE DES ABREVIATIONS 11

INTRODUCTION 15

I- CHAPITRE 1. LA NEUROFIBROMATOSE DE TYPE 1 : UN SYNDROME DE PREDISPOSITION TUMORALE 16

I-1. PRESENTATION GENERALE : NF1, UNE RASOPATHIE 16

I-2. DESCRIPTION CLINIQUE DE LA NF1 18
I-2.1. Critères diagnostiques et période d'apparition des symptômes de la NF1 18
I-2.2. NF1 et tumeurs 19

I-3. LA NEUROFIBROMINE 23
I-3.1. La neurofibromine : inhibiteur des protéines RAS 23
I-3.2. Neurofibromine et taux d'AMPc intracellulaire 31
I-3.3. Autres fonctions de la neurofibromine indépendantes de RAS 33

I-4. LE GENE *NF1* 35
I-4.1. Altérations constitutionnelles du gène *NF1* 35
I-4.2. Altérations somatiques du gène *NF1* dans les tumeurs survenant dans le cadre de la neurofibromatose de type 1 38
I-4.3. Mutations du gène *NF1* dans les tumeurs sporadiques 39

II- CHAPITRE 2. DU NEUROFIBROME PLEXIFORME AU MPNST 42
II-1. LE NEUROFIBROME PLEXIFORME 42
II-1.1. Composition et cellules d'origine d'un neurofibrome plexiforme 42
II-1.2. Modèles murins de neurofibromes plexiformes 47
II-1.3. Rôle du microenvironnement dans le développement tumoral 50

II-2. LES MPNST 52
II-2.1. Caractéristiques anatomo-pathologiques et immunohistochimiques d'une MPNST 52
II-2.2. Grades et facteurs pronostiques des MPNST 54
II-2.3. Anomalies génomiques impliquées dans la progression des neurofibromes plexiformes en MPNST 55
II-2.4. Modèles in vivo pour l'étude de la pathogenèse de neurofibromes et MPNST. 58
II-2.5. Prise en charge des MPNST 61

III- CHAPITRE 3. IMPORTANCE DE LA VOIE DE SIGNALISATION WNT AU COURS DES PROCESSUS DE TUMORIGENESE 65
III-1. SIGNALISATION DE LA VOIE WNT 65

III-2. ALTERATIONS GENETIQUES ET ANOMALIES D'EXPRESSION DE LA VOIE WNT DANS LES TUMEURS 66

III-3. ROLE DE LA VOIE WNT DANS LA REGULATION DU POOL DE CELLULES SOUCHES SOMATIQUES 67

III-4. ROLE DE LA VOIE WNT DANS LA REGULATION DU POOL DE CELLULES SOUCHES CANCEREUSES 68
III-5. ROLE DE LA VOIE WNT DANS LA TRANSITION EPITHELIO-MESENCHYMATEUSE (EMT) 69

IV- CHAPITRE 4. *SUZ12*, GENE CANDIDAT POUR EXPLIQUER LE PHENOTYPE PARTICULIER DES PATIENTS NF1 DELETES 70
IV-1. LES GRANDES DELETIONS GERMINALES DU *LOCUS NF1* PREDISPOSENT A LA SURVENUE DE MPNST 70

IV-2. MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES DES HISTONES ET MODULATION DE L'EXPRESSION GENIQUE 71
IV-2.1. Organisation de la chromatine 71
IV-2.2. Variants d'histones 73
IV-2.3. Modifications post-traductionnelles des histones 74

IV-3. LE COMPLEXE PRC2, UN REPRESSEUR TRANSCRIPTIONNEL 75
IV-3.1. Identification des protéines des complexes Polycomb 75
IV-3.2. Les complexes PRC1 et PRC2 78
IV-3.3. Structure du PRC2 80
IV-3.4. Fonction 85
IV-3.5. Gènes cibles 87
IV-3.6. Recrutement 88

IV-4. PRC2 ET CANCERS 91
IV-4.1. Expression élevée d'EZH2 dans les carcinomes 92
IV-4.2. Remaniements chromosomiques impliquant des acteurs du PRC2 dans des tumeurs endométriales et les tumeurs fibromyxoïdes ossifiantes 93
IV-4.3. Mutations gain-de-fonction d'EZH2 dans les lymphomes 95
IV-4.4. Mutations d'*EZH2*, de *SUZ12* ou d'*EED* dans d'autres hémopathies 96
IV-4.5. Mutations de la lysine 27 dans les gliomes de haut grade 97
IV-4.6. Mutation des déméthylases d'H3K27 : UTX et JMJD3 99
IV-4.7. Particularités du PRC2 101
IV-4.8. Létalité synthétique 103

IV-5. PRC2 ET PATHOLOGIE DU NEURO-DEVELOPPEMENT 104
IV-5.1. Rôle du PRC2 dans le développement neuronal 104
IV-5.2. Mutations de membres du PRC2 dans un syndrome neuro-développemental: le syndrome de Weaver 105

OBJECTIFS DE THESE 109

RESULTATS 111

I- APPROCHE 1. 112
I-1. OBJECTIF DE L'ETUDE 112
I-2. DESIGN DE L'EXPERIENCE 112
I-3. RESULTATS 112
I-4. DISCUSSION 137

II- APPROCHE 2. 142
II-1. MISE EN EVIDENCE DE L'INACTIVATION GENETIQUE DU PRC2 AU COURS DE LA TUMORIGENESE NF1 142
II-1.1. Objectif de l'étude 142

II-1.2. Design de l'expérience 142
II-1.3. Matériels et méthodes 142
II-1.4. RESULTATS 149
II-1.5. DISCUSSION 154

II-2. INVESTIGATION DE L'ABSENCE DE MUTATIONS D'*EZH2* DANS LES MPNST ASSOCIEES A LA NF1 160
II-2.1. Introduction 160
II-2.2. Material and methods 162
II-2.3. Results 164
II-2.4. Discussion 168
II-2.5. Figure legends 169
II-2.6. Supplementary figure legends 174
II-2.7. Bibliography 176

II-3. IDENTIFICATION DES VOIES DE SIGNALISATION DEREGULEES SUITE A L'INACTIVATION DU PRC2 DANS LES TUMEURS NF1 ET POUVANT ETRE CIBLEES PAR DES THERAPIES 178
II-3.1. Introduction 178
II-3.2. Matériels et méthodes 180
II-3.3. Résultats 189
II-3.4. Discussion et perspectives 194
II-3.5. Légendes des figures 196
II-3.6. Figures 198
II-3.7. Bibliographie 202

DISCUSSION ET PERSPECTIVES 204

BIBLIOGRAPHIE 210

ANNEXES 232

ANNEXE 1: CORRESPONDANCES EN ONCO-THERANOSTIC 2015 233

ANNEXE 2: MEDECINE SCIENCE 2014 238

ANNEXE 3: NATURE 2014 241

ANNEXE 4: ALTERATIONS DE *SUZ12* ET *EED* AU SEIN DES 51 TUMEURS ET RESULTATS DES IMMUNOHISTOCHIMIES H3K27ME3 246

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figures

Figure 1. NF1 et RASopathies. 17
Figure 2. Critères diagnostiques de la NF1. 19
Figure 3. Cycle d'activation/inactivation de RAS entre les états liés au GTP et au GDP. 24
Figure 4. La voie de signalisation des protéines RAS et effecteurs activés suite à la perte de fonction de la neurofibromine. 26
Figure 5. Schéma simplifié de la voie RAF-MEK-ERK et des molécules thérapeutiques ciblant cette voie. 27
Figure 6. Schéma simplifié de la voie PI3K-AKT-mTOR et des molécules thérapeutiques ciblant cette voie. 28
Figure 7. Les protéines RAS-GAP et leurs domaines protéiques. 29
Figure 8. Structure protéique de la neurofibromine et partenaires protéiques connus. 30
Figure 10. Fréquence des altérations somatiques du gène NF1 dans les tumeurs sporadiques humaines. 40
Figure 11. Analyse des mutations de NF1, NRAS et BRAF dans 278 mélanomes cutanés du TCGA grâce à l'interface en ligne cBioPortal. 41
Figure 12. Analyse anatomo-pathologique de neurofibromes. 43
Figure 13. Schéma d'un fascicule nerveux à l'état physiologique et d'un neurofibrome. 44
Figure 14. Profil d'expression des cellules précurseurs des cellules de Schwann. 45
Figure 15. Capsule frontière. 46
Figure 16. Les possibles interactions entre les cellules de Schwann inactivées NF1 et les autre types cellulaires hétérozygotes NF1 au sein du microenvironnement tumoral. 52
Figure 17. Caractéristiques anatomo-pathologiques et immunohistochimiques des MPNST. 54
Figure 18. Locus CDKN2A-CDKN2B. 56
Figure 19. Schéma de la voie WNT. 66
Figure 20. Principaux composants de la voie WNT/ β -caténine mutés dans les cancers. 67
Figure 21. Structure du cœur d'un nucléosome. 72
Figure 22. Modifications post-traductionnelles des histones et épigénétique. 73
Figure 23. Représentation schématique des variants d'histones H3. 74
Figure 24. Organisation du locus Hox chez la Drosophile et l'homme. 76
Figure 25. Phénotype du mutant Extra-Sex Combs. 77
Figure 26. Complexe Polycomb PRC2 et PRC1. 78
Figure 27. Représentation des quatre sous-unités protéiques principales ainsi que de leurs principaux domaines. 82
Figure 28. Méthylation d'H3K27. 86
Figure 29. Principales interactions de PRC2 avec la chromatine et l'ADN. 88
Figure 30. ANRIL et PRC2. 90
Figure 31. Les altérations des acteurs impliqués dans l'établissement et le maintient de la méthylation d'H3K27 dans différents types de cancers. 91
Figure 32. Evaluation de la valeur pronostique du niveau d'expression d'EZH2 indépendamment de la prolifération dans les cancers du sein humains. 93
Figure 33. Régions cérébrales dans lesquelles surviennent sélectivement les mutations H3K27M. 98

Figure 34. Inactivation d'UTX dans les LAL-T. 100

Figure 35. Conséquences connues ou supposées des altérations du PRC2 sur la répression transcriptionnelle. 102

Figure 36. Modèle de létalité synthétique entre la mutation d'ARID1A et l'inhibition de l'activité méthyl-transférase d'EZH2 dans les cancers de l'ovaire. 104

Figure 37. Photos d'un patient atteint du syndrome de Weaver et d'un patient NF1 porteur d'une délétion du locus 17q11.2. 105

Figure 38. Représentation des localisations des mutations affectant EZH2 dans le syndrome de Weaver. 107

Figure 39. Représentation schématique et évolution des différents types de neurofibromes dans la NF1. 109

Figure 40. Représentation schématique de l'hypothèse de travail de l'approche 2. 110

Figure 41. Interaction entre la voie WNT/ β -caténine et d'autres voies de signalisation impliquées dans la tumorigenèse des MPNST. 140

Figure 42. Schéma de la voie canonique WNT/ β -caténine et des inhibiteurs pharmacologiques en développement dans le cancer. 141

Figure 43. Cinq étapes sont nécessaires au NGS. 144

Figure 44. Processus de l'analyse bio-informatique depuis la génération du signal jusqu'à l'identification des variants de séquences : génération des différents formats de fichiers. 147

Figure 45. Profils de CGH-array de deux MPNST présentant une délétion. 150

Figure 46. Représentation schématique de quelques résultats représentatifs de CGH-array des MPNST aux loci de NF1, SUZ12 et EED. 151

Figure 47. Représentation schématique des localisations des mutations de SUZ12 et EED. 153

Figure 48. Bilan des altérations des membres du PRC2 retrouvées dans les MPNST. 153

Figure 49. Exemple représentatif de marquages immunohistochimiques H3K27me3 sur coupes de MPNST. 154

Figure 50. Profil de CGH-array du chromosome 17 pour quatre MPNST. 156

Figure 51. Schéma du modèle d'isodisomie uniparentale interstitielle proposé pour la tumeur mutée EED homozygote avec conservation du nombre de copies. 157

Figure 52. Mécanisme du génome éditing par CRISPR-Cas9. 181

Figure 53. Schéma du principe du ciblage d'exon. 181

Figure 54. Schéma des PCR de génotypage des clones ciblés. 182

Figure 55. Principe du crible pan-génomique CRISPR-Cas9. 186

Tableaux

Tableau I. Tumeurs malignes associées à la NF1. 22

Tableau II. Interacteurs de la neurofibromine et domaines d'interaction. 34

Tableau III. Liste des 15 gènes situés dans la région 17q11.2 comprise entre les NF1-REP-a et -c. 37

Tableau IV. Liste des essais cliniques ayant lieu chez des patients présentant des MPNST répertoriés sur clinicaltrials.gov 63

Tableau V. Caractéristiques cliniques particulières retrouvées chez les patients porteurs de délétions de l'ensemble du locus NF1. 71

Tableau VI. Caractéristiques des principaux composants du PRC2. 81

Tableau VII. Détail des séquences génomiques choisies pour le design, des séquences exoniques théoriquement séquencées et de la couverture théorique par gène. 145

Tableau VIII. Liste des mutations ponctuelles retrouvées dans SUZ12 et EED dans les MPNST. 152

TABLE DES ABREVIATIONS

ACVR1	Activin A receptor type 1
ADNg	ADN génomique
AEBP2	AE Binding Protein 2
AF6	Acute lymphoblastic leukemia 1 fused gene on chromosome 6
AML	Leucémie Aigue Myéloide
ANRIL	Antisense Non-coding RNA in the INK4 Locus
APC	Adenomatous Polyposis Coli
ARAF	v-raf murine sarcoma 3611 viral oncogene homolog
ARID	AT-Rich Interaction Domain
ARNgs	ARN guide simple brin
ARNnc	ARN non codant
ATB	Antibiotique
BAP1	BRCA1-associated protein 1
BET	Bromodomain and ExtraTerminal
bFGF	Basic Fibroblast Growth factor
BMI	BMI proto-oncogen, polycomb ring finger
BRAF	v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1
BRD4	BRomoDomain containing 4
BTK	Bruton's tyrosine kinase
CAF1	Chromatin Assembly Factor 1
CDK	Cyclin dependant kinase
CDKN2A	Cyclin-Dependent Kinase iNhibitor 2A
CFC	Syndrome Cardio-Facio-Cutané
CGH	Comparative Genomic Hybridization
ChIP-seq	Chromatin ImmunoPrecipitation –sequencing
ChRCC	Carcinome Rénal à Cellules Chromophobes
CK1	Casein Kinase 1
CM-AVM	Syndrome de Malformation Capillaire Familial
CN-LOH	Copy Neutral Loss Of Heterozygosity
COSMIC	Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer
CRAF	v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
CRISPR	Clustered regularly interspaced short palindromic repeats
CS	Syndrome de Costello
CSC	Cellules souches cancéreuses
CSCN	Cellules souches de la crête neurale
CSRD	Cystein Serin riched domain
CSS	Cellules souches somatiques
CTD	Carboxy-terminal domain
CXCL12	C-X-X motif chemokine ligand 12
CXCR4	C-X-X motif chemokine receptor 4
DHH	Desert HedgeHog
DIPG	Gliome infiltrant du tronc cérébral
DNMT	DNA (cytosine-5-)-MethylTransferase
DNMT3A	DNA (cytosin-5)-methyltransferase 3 alpha
DVL	dishevelled
EED	Embryonic Ectoderm Development
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EMT	Transition épithélio-mésenchymateuse
EP400	E1A binding protein 400
EPC1	Enhancer of polycomb homolog 1
ERBB2	Erb-b2 receptor tyrosine kinase 2
ERK	Extracellular signal-Regulated Kinase
ESC	Extra-sex combs

ESMO	European society for medical oncology
EZH1/2	Enhancer of Zeste Homolog 1/2
FAK	Focal Adhesion kinase
FBAT	Family-Based Association Study
FBS	Fetal bovine serum
FZD	Frizzled
GAP	GTPase Activating Protein
GBM	GlioBlastome Multiforme
GDE	Gène différentiellement exprimé
GDP	Guanosine DiPhosphate
GeCKo	Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout
GEF	Guanine nucleotide Exchange Factor
GHG	Gliome de haut-grade
GIST	Gastro-Intestinal Stromal Tumors
GPHG	Gliome pédiatrique de haut-grade
GRD	GAP Related Domain
GRF	Guanine nucleotide Releasing Factor
GRP	Guanine nucleotide Releasing Protein
GSK3béta	Glycogen synthase kinase 3 béta
GTP	Guanosine TriPhosphate
GVO	Gliome des Voies Optiques
H2AK119ub	Ubiquitinylation de la lysine 119 de l'histone H2A
H3K27me3	Triméthylation de la lysine (K) 27 de l'histone H3
HDAC	Histone DeACetylase
HDR	Homology-directed repair
HER	Human EGFR Related
HOTAIR	HOX Antisense Intergenic RNA
HOX	Homeobox
HRAS	Harvey RAS viral oncogene homolog
HTA	Hypertension artérielle
IHC	Immunohistochimie
ISCA	International standards for cytogenomic arrays
JARID2	Jumonji AT Rich Interactive Domain 2
JAZF1	JAZF zinc finger 1
JMJD3	JMJC-Domain protein 3
jpf	Jour post-fertilisation
KDM	Lysine (K)-specific DeMethylase
KIT	KIT proto-oncogene receptor tyrosine kinase
KO	KnockOut
KRAS	Kirsten RAS viral oncogene homolog
LAL-T	Leucemie aigue lymphoblastique
LCMM	Leucémies chroniques myélomonocytaires
LDGCB	Lymphomes diffus à grandes cellules B
LEF	Lymphoid enhancer-binding factor
LF	Lymphomes folliculaires
LMMJ	Leucémie MyéloMonocytaire juvénile
LOH	Loss Of Heterozygosity
LRP	Low density lipoprotein receptor-related protein
MAF	Minimum Allele Frequency
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MBL	Médulloblastome
MEAF6	MYST/Esa1 associated factor 6
MEK	Mitogen-activated and Extracellular-signal regulated Kinase kinase
MET	MET proto-oncogene receptor tyrosine kinase
MMR	Mismatch repair
MOI	Multiplicity of infection
MPSNT	Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumour
MPT	Modifications post-traductionnelles
MPZ	Myelin Protein P0
MTF2	Metal response element binding Transcription Factor 2

mTOR	Mammelian Target of Rapamycin
NAHR	Non Allelic Homologous Recombination
NF1	Neurofibromine 2
NF1	Neurofibromatose de type 1
NF1	Neurofibromine 1
NF2	Neurofibromatose de type 2
NHEJ	Non homologous end joining
NIH	National Institute of Health
NRAS	Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog
NS	Syndrome de Noonan
NSD1	Nuclear receptor binding SET domain protein 1
NSE	Nodules stromales de l'endomètre
NSML	Syndrome de Noonan avec Multiples Lentigines
NuRD	CHD-class RemoDeling complex
NURF	ISWI- class Nucleosome Remodeling complex
NUT	Nuclear Protein in Testis
OMS	Organisation mondiale de la santé
PAM	Protospacer Adaptor Motif
pb	Paire de Bases
PcG	Groupe Polycomb
PcG	Polycomb
PCGF	Polycomb group ring finger
PCL	PolyComb Like
PCP	Planar-Cell Polarity
PDFRA	Platelet-Derived Growth Factor-Alpha
PH	Pleckstrine
PHF	PHD Finger Protein
Pho-RC	Pho-Repressive Complex
PI3K	PhosphatidylInositol 3-Kinase
PKA	Protein Kinase A
PLC	Phospholipase C
pr	Protéines ribosomiales
PR-DUB	Polycomb repressives deubiquitinase
PRC1	Polycomb Repressive Complex 1
PRC2	Polycomb Repressive Complex 2
pRCC	Carcinome Rénal à Cellules papillaires
PRE	Polycomb Responsive Elements
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog
PTM	Modification Post-Traductionnelle
RALGDS	RAL Guanine nucleotide-Dissociation Stimulator
RAS	Ras sarcoma
RASSF	Ras association domain containing family
RB	Retinoblastoma
RbAp46/48	Retinoblastoma-binding protein p46/48
RBBP	Retinoblastoma Binding Protein
RIN1	Ras Interaction/interference protein 1
RING1A/B	RING finger protein 1 A/B
RNF135	RiNg Finger protein 135
RRAS	Related to RAS
RSPO	R-spondin
RTK	Récepteur Tyrosine Kinase
SBD	Syndecan binding domain
SC	A petites cellules
SCF	Stem Cell Factor
SEC14	SEC14p-like-lipid binding domain
SET	Su(var)3-9, Enhancer of Zeste, Trithorax
SETD2	SET Domain containing 2
SH2	Src-Homology-2
SIRT1	Sirtuin-1
SMARCB1	SWI/SNF related, Matrix associated, Actin dependent Regulator of Chromatin, subfamily B,

	member 1
SMD	Syndrome myelodysplasique
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SNV	Single Nucleotide Variations
SOS	Son of Sevenless
SSE	Sarcomes stromales endomètriales
SUZ12	SUppressor of Zeste 12 homolog Drosophila
SUZ12P	SUZ12 pseudogene
TBD	Tubulin binding domain
TCF	T-Cell-specific transcription factor
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TCL	Tache café au lait
TFMO	Tumeurs fibromyxoides ossifiantes
TIAM1	T cell lymphoma Invasion and Metastasis 1
TP53	Tumor Protein p53
TP53	Tumor Protein P53
Trx	Trithorax
TSE	Tumeurs stromales endometriales
UTX	Ubiquitously-transcribed TPR protein on the X chromosome
VEFS	VRN2-EMF2-FIS2-Su(z)12
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VPC	Valosin containing domain
XIST	X-Inactive Specific Transcript
YY1	YY1 transcription factor

INTRODUCTION

I- CHAPITRE 1. La neurofibromatose de type 1 : un syndrome de prédisposition tumorale

I-1. Présentation générale : NF1, une RASopathie

Les neurofibromatoses de type 1 (NF1) et 2 (NF2) sont des maladies génétiques qui furent historiquement confondues. Il fut proposé que ces deux maladies représentent différentes manifestations d'un même syndrome. Mais avec l'avènement de la génétique moderne, la NF1 et la NF2 furent bien distinguées sur les plans moléculaires et cliniques. Cette distinction nosologique entre NF1 et NF2 a été confirmée au niveau moléculaire lorsque les gènes ont été clonés et caractérisés respectivement en 1990 (NF1) et 1993 (NF2).

La NF2 (MIM 101000) est causée par des mutations de type perte de fonction du gène suppresseur de tumeur *NF2* codant la merline (Asthagiri *et al.* 2009 pour revue). Les schwannomes bilatéraux des nerfs vestibulaires sont caractéristiques de la NF2 et atteignent 90 à 95% des patients NF2. La NF2 se distingue clairement de la NF1 qui a fait l'objet de mon travail de thèse.

La NF1 (MIM 162200) est l'une des maladies génétiques à transmission mendélienne autosomique dominante les plus fréquentes chez l'homme avec une prévalence estimée à 23 naissances sur 100 000 (*Orphanet Report Series Prevalence of rare diseases: Bibliographic data* - May 2014: http://www.orpha.net/orphacom/cahiers/docs/GB/Prevalence_of_rare_diseases_by_decreasing_prevalence_or_cases.pdf). Environ quinze mille individus sont atteints de cette maladie en France.

La NF1 résulte de mutations constitutionnelles hétérozygotes de type perte de fonction du gène suppresseur de tumeur *NF1* (*Neurofibromin 1*) codant la neurofibromine qui est une RAS-GAP (*GTPase Activating Protein*). La NF1 appartient à la famille de syndromes génétiques appelés RASopathies. Les RASopathies se définissent comme un groupe de pathologies du développement causées par des mutations germinales dans des gènes codant des composants ou des régulateurs de la voie de signalisation RAS/MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*) (Figure 1). Elles incluent en plus de la NF1, le syndrome de Noonan (NS), le syndrome de Noonan avec multiples lentigines (NSML), le syndrome de malformation capillaire familiale (CM-AVM), le syndrome de Costello (CS), le syndrome

cardio-facio-cutané (CFC) et le syndrome de Legius. La voie de signalisation RAS/MAPK est critique dans la régulation de la croissance, du cycle, de la sénescence et de la différenciation cellulaire et sa dérégulation au cours du développement a des conséquences profondes. Bien que chaque RASopathie ait son phénotype propre, la dérégulation de la voie RAS/MAPK conduit à un spectre commun d'anomalies phénotypiques. Ces caractéristiques phénotypiques communes incluent une dysmorphie cranio-faciale, des malformations cardiaques, une atteinte cutanée, musculo-squelettique et oculaire, une hypotonie et un risque accru de développer des cancers (Rauen *et al.* 2013).

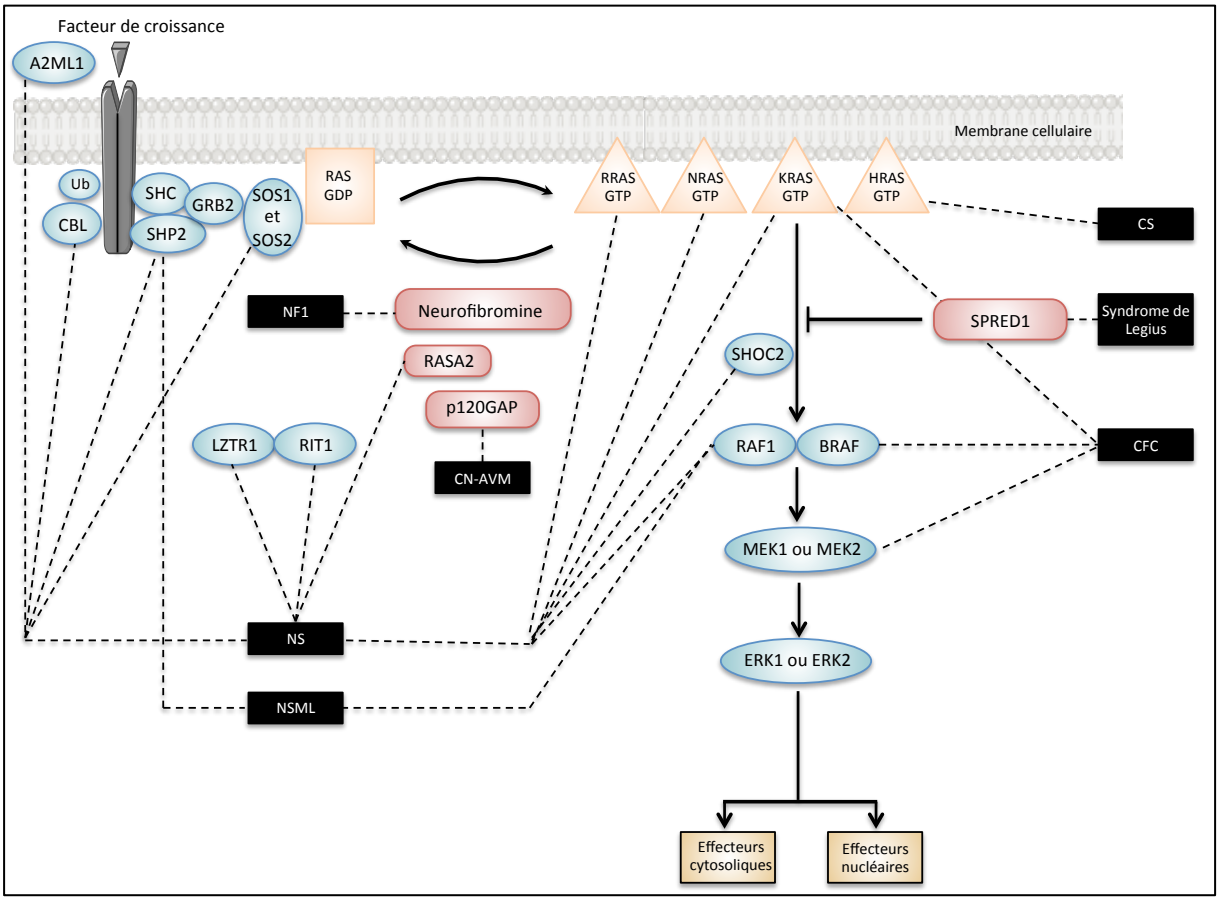


Figure 1. NF1 et RASopathies.
Des mutations constitutionnelles des gènes codant les effecteurs et régulateurs de la voie de signalisation RAS-MAPK sont à l'origine des RASopathies. Certaines RASopathies sont causées par des mutations inactivatrices dans un seul régulateur de la voie RAS-MAPK conduisant à l'activation de cette voie. C'est le cas de NF1 causée par des mutations inactivatrices du gène *NF1*. Ce gène code la neurofibromine qui est une RAS-GAP et catalyse spécifiquement l'activité GTPasique intrinsèque des petites protéines G de type RAS permettant le retour vers une conformation inactive des RAS. L'haplo-insuffisance de *RASA1* (codant la protéine p120GAP) est à l'origine du CM-AVM, l'inactivation de SPRED1 cause le syndrome de Legius et des mutations activatrices dans *HRAS* cause le CS. D'autres RASopathies présentent des mutations dans divers effecteurs. C'est le cas (i) du NSML, causé par des mutations de *PTPN11* (codant la protéine SHP2) et *RAF1* et (ii) du CFC, causé par des mutations de *BRAF, KRAS* et *MEK1* ou *MEK2*. Enfin, les NS incluant le syndrome de Noonan et et le syndrome Noonan-like sont causés par des mutations dans des gènes codant des effecteurs et régulateurs comme *PTPN11*, *SOS1*, *RAF1*, *KRAS*, *NRAS*, *SHOC2* et *CBL* Depuis 2013, de nouveaux gènes mutés dans le NS ont été identifiés dans quelques familles. Il s'agit de *RIT1*, *RRAS*, *RASA2*, *A2ML1*, *SOS2* et *LZTR1* (Aoki *et al.* 2016 pour revue)

I-2. Description clinique de la NF1

I-2.1. Critères diagnostiques et période d'apparition des symptômes de la NF1

La NF1 est une maladie génétique neuro-cutanée cliniquement hétérogène. Une anomalie de développement des crêtes neurales est à l'origine de la majorité des symptômes de la NF1. En conséquence, les symptômes les plus fréquemment retrouvés affectent des tissus dérivant des crêtes neurales tels que les mélanocytes ou le système nerveux périphérique. La présence de lésions pigmentaires découle de l'atteinte des mélanocytes.

Les critères diagnostiques de la NF1 sont des critères cliniques. Une liste de sept signes cliniques a été définie au cours de la conférence de consensus du NIH (*National Institute of Health*) de 1987 (Figure 2). La présence de deux de ces critères permet de poser le diagnostic de NF1.

- Au moins six taches café au lait (TCL) de plus de 0,5 cm dans leur plus grand diamètre chez des individus pré-pubères et de plus de 1,5 cm chez des individus pubères,
- Des lentigines axillaires ou inguinales,
- Au moins deux neurofibromes, tumeurs bénignes des gaines nerveuses, de n'importe quel type ou un neurofibrome plexiforme,
- Au moins deux nodules de Lisch (hamartomes iriens),
- Une lésion osseuse caractéristique telle une dysplasie sphénoïde ou un amincissement de la corticale des os longs avec ou sans pseudarthrose,
- Un gliome des voies optiques ,
- Un apparenté du premier degré atteint de NF1 suivant les critères précédents (parent, fratrie ou enfant).

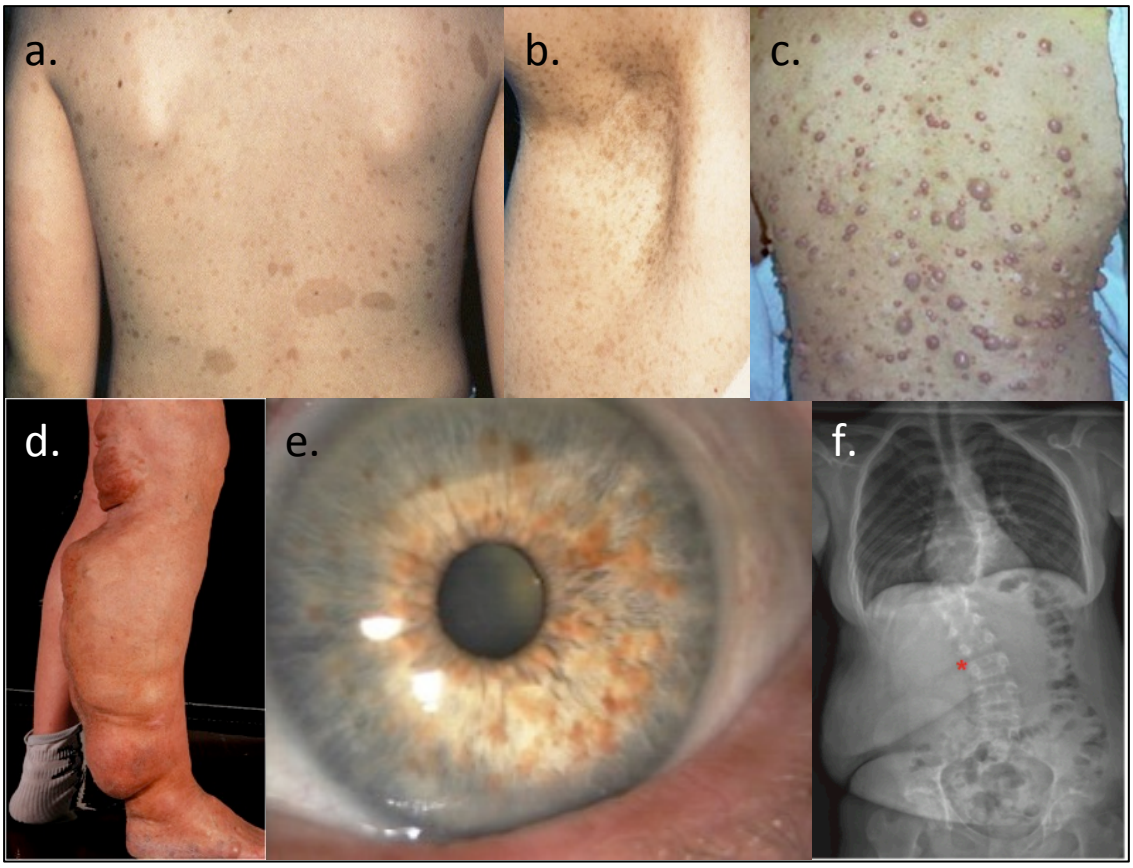


Figure 2. Critères diagnostiques de la NF1.
a. Multiples taches café-au-lait situées dans le dos d'un patient atteint de NF1. Extrait de Pinson *et al.* 2005. b. Lentigines axillaires. Extrait de Pinson *et al.* 2005. c. Neurofibromes cutanés chez un patient NF1. http://francais.medscape.com/features/diaporama/3187605. d. Neurofibrome plexiforme de la jambe droite. Extrait de Ferner *et al.* 2007. e. Multiples nodules de Lisch (http://www.snof.org/maladies/recklinghausen.html). f. Radio montrant une scoliose dystrophique chez une jeune fille de 11 ans. Extrait de Hirbe *et al.* 2014.

Bien que la pénétrance de la NF1 soit quasi-complète, la NF1 est une maladie génétique cliniquement hétérogène, même au au sein d'une même famille. Dans la majorité des cas, un examen clinique effectué par un médecin connaissant bien la maladie permet de poser le diagnostic. Chez l'adulte, le diagnostic de NF1 est en général facile à poser sur les données de l'examen clinique. Mais chez l'enfant, chez qui les TCL peuvent demeurer longtemps le seul signe, le diagnostic demeure parfois en suspens (Pinson *et al.* 2005).

I-2.2. NF1 et tumeurs

La NF1 est un syndrome de prédisposition aux tumeurs, ce qui fait de *NF1* un gène suppresseur de tumeur. La majorité des tumeurs sont bénignes (neurofibromes) mais, bien que les complications tumorales malignes soient plus rares, ce sont elles qui font la gravité de la NF1 car elles consituent la principale cause de mortalité des patients NF1. La plupart des tumeurs NF1 ont, comme cellule d'origine, des dérivées de cellules de crêtes neurales (neurofibrome, MPNST -*Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumour*-, phéochromocytome)

ou neuro-endothéliales (gliomes des voies optiques et du tronc cérébral) (détails plus loin). Mais certaines tumeurs sont issues de types cellulaires complètement différent, comme les LMMJ ou les rhabdomyosarcomes. La sensibilité de certains types cellulaires à la transformation, lorsque *NF1* est inactivé, suggère que la neurofibromine a un rôle critique par rapport aux autres protéines RAS-GAP dans ces cellules (Ratner *et al.* 2015).

I-2.2.a) Tumeurs du système nerveux

⇒ Neurofibromes

La présence de neurofibromes est l'une des caractéristiques majeures de la maladie puisque la quasi-totalité des patients développeront ce type de tumeurs bénignes des gaines nerveuses. Les neurofibromes sont des tumeurs complexes, hétérogènes sur le plan cellulaire et majoritairement composées de cellules de Schwann.

Sur le plan clinique, il est classique de distinguer les neurofibromes cutanés, nodulaires et plexiformes. Les neurofibromes plexiformes sont des tumeurs bénignes présentes chez environ 30 à 50% des patients (Huson *et al.* 1988, Ferner *et al.* 2007). Elles font courir le risque de perte de fonction du nerf initialement atteint, à laquelle peuvent s'ajouter la déformation des structures osseuses adjacentes et la compression d'autres organes, avec les risques fonctionnels et vitaux qui s'y rattachent. Les neurofibromes plexiformes peuvent être la cause de complications importantes notamment par envahissement ou compression, qui nécessitent leur exérèse chirurgicale souvent compliquée par leur importante vascularisation et leur caractère diffus infiltrant. Ils sont le seul type de neurofibromes pouvant subir une transformation maligne en MPNST.

⇒ MPNST

Les MPNST ou neurofibrosarcomes sont des tumeurs malignes représentant plus de 5% des sarcomes des tissus mous. Elles surviennent dans plus de la moitié des cas chez des individus atteints de NF1 (Hirbe *et al.* 2014). Les MPNST sont typiquement retrouvées chez des patients âgés de 20 à 50 ans, bien qu'ils puissent survenir pendant l'enfance chez les patients NF1. Les MPNST ont une prévalence de 0,001% dans la population générale versus 0,1% chez les individus NF1. Chez ces derniers, le risque cumulatif de développer une MPNST au cours de la vie est estimé autour de 10% (Brems *et al.* 2009). Ces tumeurs se développent dans un tronc nerveux périphérique comme le nerf sciatique, le plexus brachial ou le plexus sacré. Elles surviennent majoritairement dans les extrémités proximales, le tronc et la tête et cou. L'exérèse chirurgicale est la seule option curative pour les patients développant une

MPNST (Carli *et al.* 2005). Malgré l'exérèse chirurgicale, le pronostic des patients NF1 présentant des MPNST est sombre et le taux de survie à cinq ans est de 23 à 69% (Valentin *et al.* 2016). Les MPNST métastasent fréquemment. Les métastases sont souvent de localisation pulmonaire et osseuse.

⇒ Gliomes des voies optiques et du tronc cérébral

Le gliome des voies optiques (GVO) est la tumeur intracérébrale la plus fréquemment observée au cours de la NF1. Environ 15 à 20% des patients NF1 développent des tumeurs gliales de bas-grade dont 80% sont des GVO. Les GVO surviennent généralement chez l'enfant avant sa septième année. Selon la classification histologique de l'OMS, ce sont le plus souvent des tumeurs de grade I, les astrocytomes pilocytiques, de bon pronostic. Bien que majoritairement asymptomatiques, ils peuvent parfois être responsables d'une diminution de l'acuité visuelle ou d'une puberté précoce par envahissement de l'hypothalamus.
Les gliomes du tronc cérébral sont les tumeurs cérébrales en dehors des voies optiques les plus fréquentes chez les patients NF1. Comme pour les GVO, il s'agit la plupart du temps d'astrocytomes pilocytiques.

⇒ Glioblastomes

Les individus NF1 ont un risque au moins cinq fois plus élevé par rapport à la population générale de développer d'autres tumeurs cérébrales dont les astrocytomes de grade IV (les glioblastomes) qui sont des tumeurs malignes de mauvais pronostic.

I-2.2.b) Autres tumeurs malignes

De nombreuses autres tumeurs, solides ou hématologiques, ont été décrites en association avec la NF1 (Brems *et al.* 2009 ; Hirbe et Gutmann 2014) (Tableau I).

- Les tumeurs stromales gastro-intestinales (GIST) sont des tumeurs d'origine mésenchymateuse pouvant se développer tout le long du tractus gastro-intestinal. Les patients NF1 développent plus souvent des GIST multiples que la population générale. Des tumeurs carcinoïdes duodénales, qui sont des tumeurs neuroendocrines, ont en outre été rapportées chez 1% patients NF1.
- La NF1 prédispose à la survenue d'hémopathies malignes comme la leucémie myélomonocytaire juvénile (LMMJ) qui est l'hémopathie maligne la plus fréquemment retrouvée chez les enfants atteints de NF1.

- Des phéochromocytomes sont également décrits plus fréquemment chez les patients NF1 que dans la population générale (0,1-5,7% chez les patients NF1 versus 0,002-0,008% dans la population générale).
- Des rhabdomyosarcomes et des neuroblastomes sont des néoplasies pédiatriques plus souvent observées chez les enfants porteurs de NF1 que chez les autres enfants.
- Un risque augmenté de cancer du sein a été rapporté chez les femmes de moins de 50 ans atteintes de NF1 (Madanikia *et al.* 2012 ; Wang *et al.* 2012).

Tableau I. Tumeurs malignes associées à la NF1. Adapté d'après Brems *et al.* 2009 et Hirbe et Gutmann 2014.

Tumeur associée à la NF1	Catégorie d'âge	Risque de survenue au cours de la vie	Principaux mécanismes moléculaires
MPNST	Adolescence, Adulte	8-13%	Deuxième hit dans *NF1*, multiples altérations du nombre de copies, délétion de *CDKN2A*
Gliome des voies optiques	Pédiatrique	15-20%	Deuxième hit dans *NF1*, délétion de *CDKN2A*
Rhabdomyosarcome	Pédiatrique	1.4-6%	Inconnu
Neuroblastome	Adulte jeune	Augmenté de 5 fois par rapport à la population générale	Deuxième hit dans *NF1*, amplification de *MYCN*, délétion de la région chromosomique 1p36
LMMJ	Pédiatrique	Augmenté de 200 fois par rapport à la population générale	Deuxième hit dans *NF1*, mutations activatrices de *SETBP1* et *JAK3* (Sakaguchi *et al.* 2013)
GIST	Adulte	4-25%	Deuxième hit dans *NF1*, quelques altérations du nombre de copies
Phéochromocytome	Adulte	0,1-5,7%	Deuxième hit dans *NF1*
Tumeur carcinoïde	Adulte	1%	Deuxième hit dans *NF1*
Cancer du sein	Adulte	Augmenté de 5 fois par rapport à la population générale	Inconnu

GIST (*Gastro-Intestinal Stromal Tumors*) : Tumeur stromale gastro-intestinale ; LMMJ : Leucémie MyéloMonocytaire Juvénile

I-3. La neurofibromine

La neurofibromine, codée par le gène *NF1*, est une grande protéine de 2818 acides aminés et de masse moléculaire d'environ 280 KDa (Trovó-Marqui *et al.* 2006). Elle est principalement localisée dans le cytoplasme et est d'expression ubiquitaire. Le rôle le mieux documenté de la neurofibromine est celui d'inhibiteur des protéines RAS.

I-3.1. La neurofibromine : inhibiteur des protéines RAS

I-3.1.a) Les protéines RAS et leur cycle d'activation GDP/GTP

⇒ Les protéines RAS

Les protéines RAS (*Ras Sarcoma*) occupent une place centrale dans le destin de la cellule en couplant l'activation d'un récepteur cellulaire à des voies de signalisation effectrices en aval. Ces voies de signalisation jouent un rôle essentiel dans des processus aussi variés que la survie, la prolifération et la différenciation cellulaire (Pour revue Schubbert *et al.* 2007).

La famille des RAS GTPases comprend 36 gènes codant 39 protéines RAS (Karnoub *et al.* 2008). Les protéines RAS les plus étudiées sont les protéines HRAS, NRAS et KRAS codées par les oncogènes *HRAS* (*Harvey RAS viral oncogene homolog*), *NRAS* (*Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog*) et *KRAS* (*Kirsten RAS viral oncogene homolog*), dans lesquels des mutations activatrices sont très fréquemment retrouvées dans différents cancers (Colicelli 2004). Des mutations activatrices de RAS sont retrouvées dans environ 33% des cancers humains (mutations répertoriées dans le catalogue des mutations somatiques COSMIC (*Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer*)). Des protéines apparentées aux RAS, les RRAS (*Related to RAS* : R-RAS, R-RAS2 -aussi appelée TC21-, R-RAS3 -aussi appelée M-RAS-) semblent être impliquées dans le contrôle de la mitose et du cytosquelette. Les protéines RRAS ont été bien moins étudiées que les RAS oncogéniques. Il semble cependant que ces deux classes de RAS aient des effecteurs communs (Colicelli 2004 ; Flex *et al.* 2014).

Les protéines RAS sont des petites protéines G qui possèdent un ensemble de séquences conservées «G-box». Ces éléments constituent un domaine G d'environ 20kDa à la structure conservée et aux propriétés biochimiques communes à toutes les protéines RAS.

Les protéines RAS sont sujettes à des modifications lipidiques essentielles à l'association aux membranes cellulaires. Ainsi, les résidus cystéines en C-terminal de RAS sont isoprénylés. Cette modification covalente post-transcriptionnelle est impliquée dans la localisation subcellulaire de RAS à la membrane, et peut donc influencer la liaison ou l'activation d'effecteurs et l'interaction de protéines régulatrices (Wennerberg *et al.* 2005).

Les protéines RAS sont de petites GTPases qui oscillent entre une conformation inactive lorsqu'elles sont liées au GDP (*Guanosine DiPhosphate*) (RAS-GDP) et active lorsqu'elles sont liées au GTP (*Guanosine TriPhosphate*) (RAS-GTP). RAS-GTP possède une haute affinité de liaison pour le GTP et le GDP, une activité faible d'hydrolyse intrinsèque pour le GTP et une activité faible d'échange GDP/GTP. La liaison du GTP ou du GDP à RAS induit un changement de conformation de la protéine, la conformation liée au GTP possédant une affinité augmentée pour les effecteurs. Le cycle GTP/GDP est contrôlé par deux classes principales de protéines régulatrices : les protéines d'échange GEF (*Guanine nucleotide-Exchange Factor*) et les protéines d'activation de l'activité GTPase, les GAP (*GTPase Activating Protein*). Les protéines GEF stimulent l'activité d'échange intrinsèque GDP/GTP de RAS et favorisent la formation de la forme active RAS-GTP. Les protéines GAP stimulent l'activité d'hydrolyse intrinsèque du GTP des RAS et favorisent la formation de la forme inactive RAS-GDP (Figure 3).

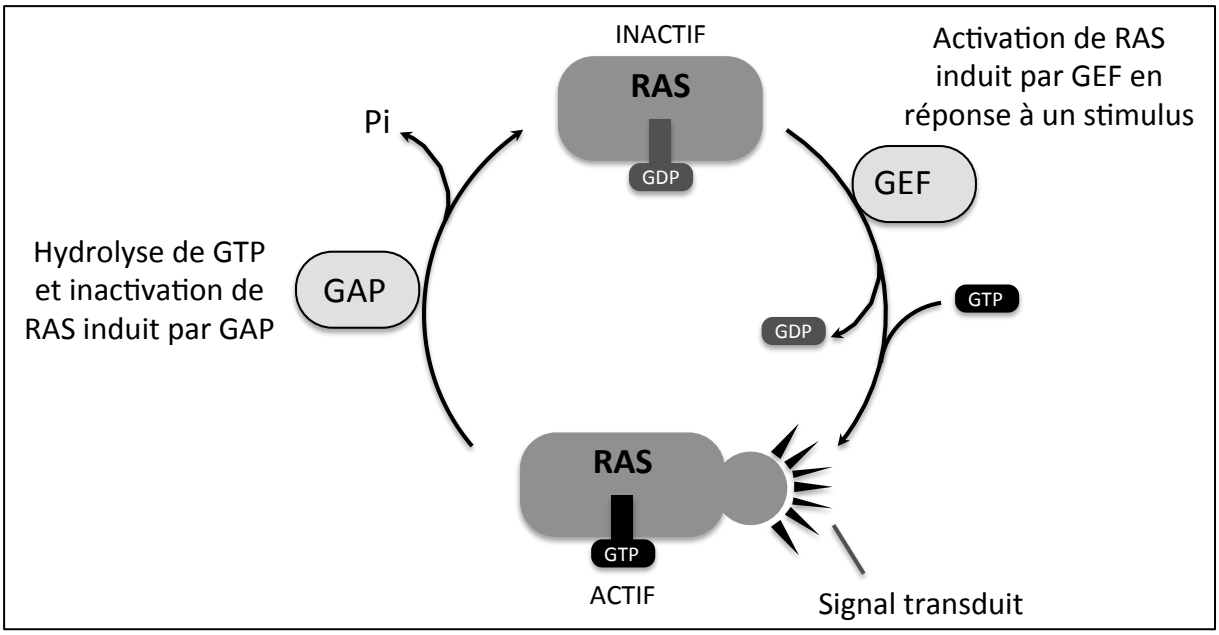


Figure 3. Cycle d'activation/inactivation de RAS entre les états liés au GTP et au GDP.
A l'état inactif RAS est lié au GDP. Lors de la stimulation cellulaire, les GEFs de RAS (dont les protéines SOS1 et SOS2) sont activés et catalysent l'échange de GDP en GTP qui s'accompagne d'un changement de conformation de RAS. RAS-GTP peut alors interagir avec différents effecteurs et induit ainsi des voies de signalisation intracellulaires spécifiques. Le retour de RAS à l'état basal nécessite l'intervention de protéines GAP dont la neurofibromine et la p120RasGAP qui activent l'activité GTPasique intrinsèque de RAS.

⇒ Activation de RAS

Les protéines RAS sont des molécules commutatrices impliquées dans la transduction du signal induit par des stimuli extracellulaires multiples dont les facteurs de croissance. La liaison de facteurs de croissance aux récepteurs de surface crée un site d'amarrage intracellulaire pour des molécules adaptatrices et des protéines de relai de signal qui, à leur tour, recrutent et activent des facteurs d'échange GEF. Une voie d'activation de RAS très étudiée est l'activation via les récepteurs tyrosine kinase (RTK), comme par exemple ceux de la famille des HER (*Human EGFR Related*). Cette famille HER comprend différents RTK partageant des homologies structurelles et fonctionnelles importantes. Elle incluse notamment le HER1/EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*)/c-erbB1, HER2/c-erbB2, HER3/c-erbB3 et HER4/c-erbB4 . L'activation de ce type de récepteur induit son autophosphorylation sur sa partie intracellulaire. Le RTK phosphorylé est reconnu et lié par le domaine SH2 (*Src-Homology-2*) de la protéine GRB2 (*Growth-factor-Receptor Bound protein 2*). Via son domaine SH3, GRB2 lie alors les protéines GEF, SOS1 (*Son of Sevenless*) et SOS2, qui activent à leur tour RAS.

Il existe trois principales classes de GEF : les protéines SOS, les RAS-GRF (*Guanine nucleotide-Releasing Factor*) et les RAS-GRP (*Guanine nucleotide-Releasing Protein*). Ces protéines se distinguent par leur action sur des RAS différentes et leur activation par des *stimuli* en amont différents. Elles possèdent aussi des fonctions catalytiques additionnelles (Vigil *et al.* 2010). Les GEF catalysent le relargage du GDP de RAS et permettent la liaison passive du GTP qui est présent en abondance dans le cytosol. En effet, le taux de GTP dans le cytosol est en général plus de dix fois supérieur au taux de GDP. La liaison du GTP à RAS induit un changement conformationnel de RAS qui augmente son affinité pour ses effecteurs (Figure 4).

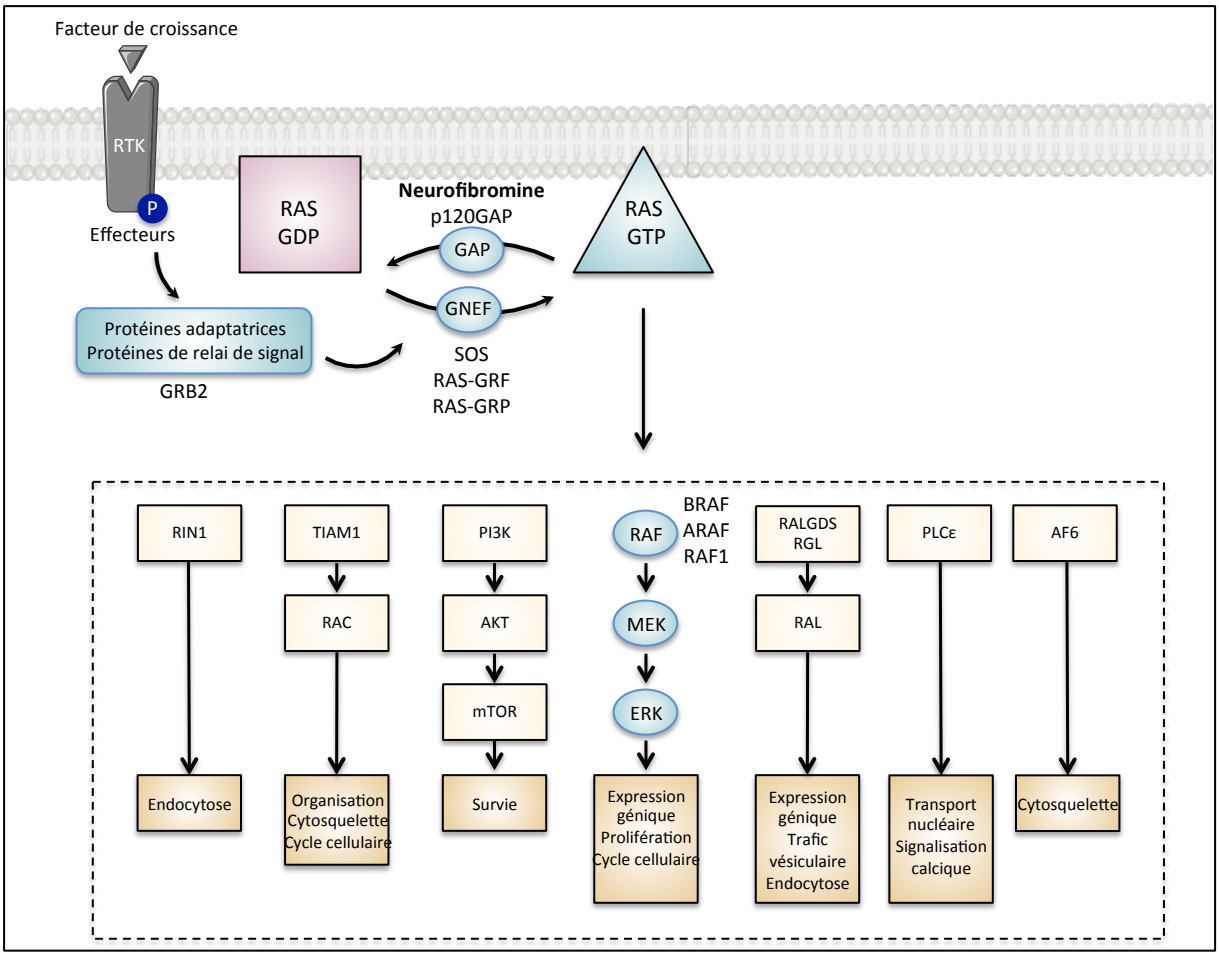


Figure 4. La voie de signalisation des protéines RAS et effecteurs activés suite à la perte de fonction de la neurofibromine.
Les protéines RAS régulent des voies de signalisation contrôlant de nombreuses réponses cellulaires comme la prolifération, la survie et la différenciation cellulaire. Les voies de signalisation les mieux documentées en aval de RAS sont les voies RAF/MEK/ERK, PI3K/AKT/mTOR, PI3K/RAC et RALGDS/RAL. L'activation de la voie RAS est fréquemment associée au développement tumoral. D'après Karnoub *et al.* 2008 ; Malumbres *et al.* 2003 ; Schubbert *et al.* 2007.

⇒ Voies effectrices de RAS

RAS-GTP peut interagir avec différents effecteurs parmi lesquels se trouvent en premier lieu RAF, PI3K (*PhosphatidylInositol 3-Kinase*) et RALGDS (*RAL Guanine nucleotide-Dissociation Stimulator*).

La cascade RAF-MEK (*Mitogen-activated and Extracellular-signal regulated Kinase kinase*)-ERK (*Extracellular signal-Regulated Kinase*) est la voie effectrice de Ras la mieux caractérisée. Il existe trois kinases RAF sérine/thréonine différentes : ARAF (*v-raf murine sarcoma 3611 viral oncogene homolog*), BRAF (*v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1*) et RAF1 ou CRAF (*v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1*) qui activent la cascade des kinases MEK/ERK. ERK peut phosphoryler divers substrats à la fois cytosoliques et nucléaires et contrôler l'expression de nombreux gènes. Cette voie joue un rôle majeur dans le contrôle du cycle cellulaire et la prolifération et est donc très importante

en cancérologie. Des inhibiteurs de RAF, de MEK ou d'ERK ont été développés pour contrer la progression tumorale (Figure 5).

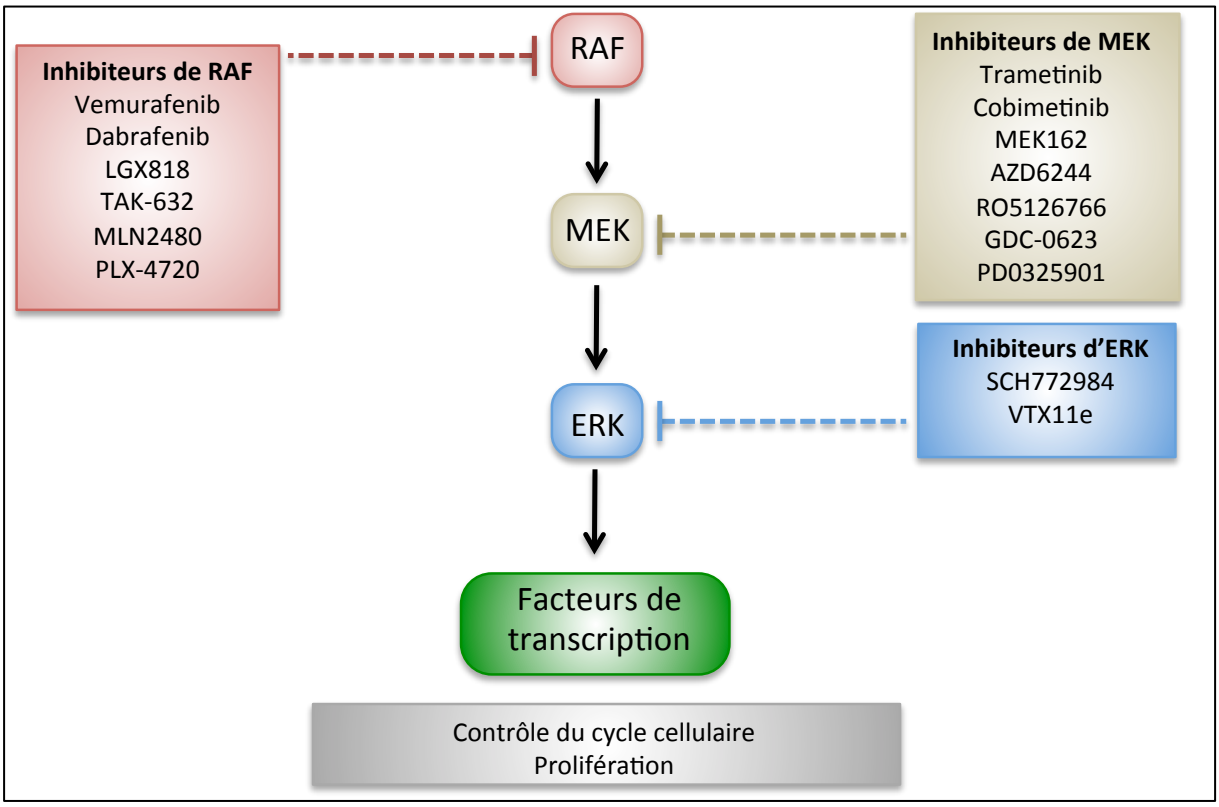


Figure 5. Schéma simplifié de la voie RAF-MEK-ERK et des molécules thérapeutiques ciblant cette voie. D'après Samatar *et al.* 2014

RAS-GTP peut aussi se lier à PI3K. Cette liaison conduit à la translocation de PI3K à la membrane plasmique et son activation. PI3K active alors la voie AKT-mTOR (*Mammalian Target Of Rapamycin*) impliquée dans de nombreuses fonctions cellulaires essentielles notamment le métabolisme, la prolifération, la migration, la survie et l'angiogenèse (Rodon *et al.* 2013). La voie PI3K-AKT-mTOR est inhibée par PTEN (*Phosphatase and TENsin homolog*) grâce à l'activité lipides-phosphatase de ce dernier (Figure 6). La voie PI3K-AKT-mTOR est une voie fréquemment activée dans divers types de cancers et a donc fait l'objet d'études intensives pour le développement de molécules thérapeutiques ciblant spécifiquement cette voie. Nombre de ces molécules font l'objet d'essais cliniques (Rodon *et al.* 2013).

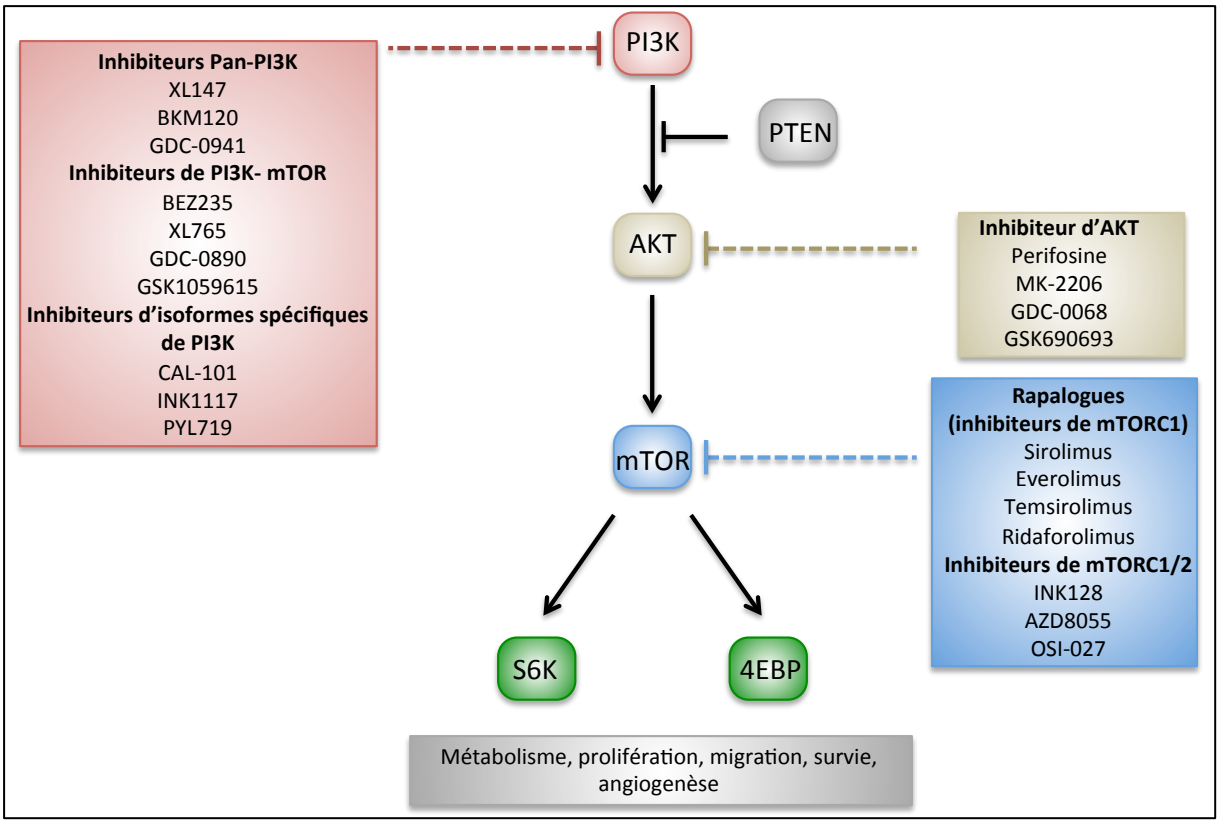


Figure 6. Schéma simplifié de la voie PI3K-AKT-mTOR et des molécules thérapeutiques ciblant cette voie. D'après Rodon *et al.* 2013.

PI3K peut aussi activer RAC ; cette protéine est impliquée dans l'organisation du cytosquelette et dans le contrôle du cycle cellulaire. Son rôle dans la tumorigenèse, dont celle des MPNST, a été rapporté (Upadhyaya *et al.* 2012, Rossman *et al.* 2005).

RAS-GTP peut activer une famille de facteurs d'échange des petites GTPases RAL incluant RALGDS et les protéines RALGDS-like (RGL). Les RALGDS et RGL activent à leur tour les protéines RAL impliquées dans le trafic vésiculaire et l'endocytose et dont le rôle critique en cancérologie a été décrit (Bodemann *et al.* 2008).

D'autres effecteurs ont été identifiés et sont activés lors de la perte de fonction de la neurofibromine comme PLC-ε (*Phospholipase C-ε*), TIAM1 (*T-cell lymphoma Invasion And Metastasis -1*), RIN1 (*Ras INteraction/interference protein 1*), AF6 (*Acute lymphoblastic leukemia-1 Fused gene on chromosome 6*) et les protéines RASSF (*Ras ASSociation domain-containing Family*). Au total, plus de 20 effecteurs différents ont été décrits. RAS-GTP peut donc réguler un réseau complexe de voies de signalisation aux rôles divers (Karnoub *et al.* 2008).

I-3.1.b) La neurofibromine, une RAS-GAP inhibitrice de RAS

⇒ Inhibition de RAS

L'activité GTPasique intrinsèque des protéines RAS est faible à l'état basal, ce qui favorise la transduction prolongée du signal. Cette activité GTPasique est stimulée par les protéines GAP qui régulent donc négativement les protéines RAS. Les protéines GAP induisent l'hydrolyse du GTP en GDP de RAS. Les RAS-GAP ont en commun un domaine catalytique d'environ 250 acides aminés. Les séquences (ou domaines) protéiques flanquant ce domaine commun sont, en revanche, très variables. Malgré la présence de ce domaine commun, les membres de la famille des RAS-GAP ont différents modes de régulation et d'association à la membrane plasmique. Les tumeurs associées à une mutation de RAS deviennent, en général, résistantes à l'action des RAS-GAP. Les deux principales RAS-GAP sont la neurofibromine et le p120GAP (RASA1). D'autres RAS-GAP ont cependant été identifiées : RASA2/GAP1^{m}, RASA3/GAP1^{IP4BP}, RAS4/CAPRI, RASAL1, SynGAP/p135SynGAP et DAB2IP (*DOC-2/DAB2 Interactive Protein*) (Mitin *et al.* 2005) (Figure 7).

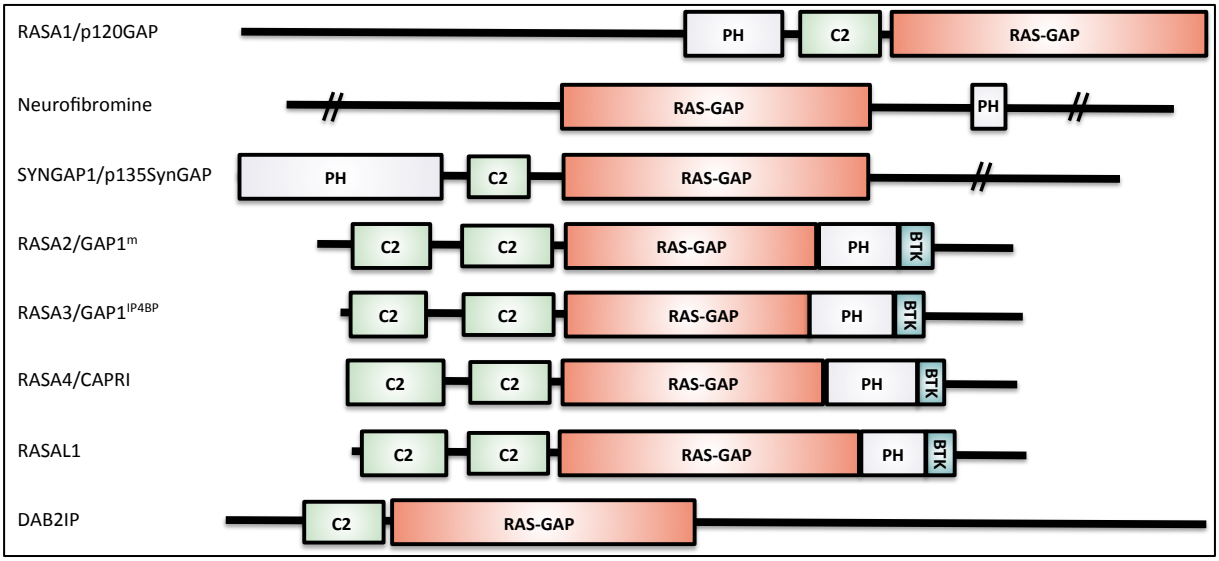


Figure 7. Les protéines RAS-GAP et leurs domaines protéiques.
Les RAS-GAP ont en commun un domaine catalytique d'environ 250 acides aminés. Les autres domaines de ces protéines sont un domaine homologue de la pleckstrine (PH), C2 (*protein kinase C conserved region 2*) qui est un motif de liaison Ca^{2+} dépendant aux lipides, et BTK (*Bruton's tyrosine kinase*) qui est un motif riche en cystéine de liaison au zinc. D'après Mitin *et al.* 2005.

⇒ Domaine GRD de la neurofibromine et interactions

La neurofibromine inactive aussi bien les RAS oncogéniques que les R-RAS. Plusieurs membres de ces deux sous-familles (H-RAS, N-RAS, K-RAS, R-RAS et R-RAS2) sont simultanément exprimés et activés dans les cellules de Schwann. La fonction d'inhibition des

RAS est assurée par le domaine RAS-GAP aussi appelé GRD (*GAP-Related Domain*), homologue aux protéines activatrices des GTPases de *Saccharomyces cerevisiae* IRA1 et IRA2. Ce domaine est situé au centre de la neurofibromine : il est composé de la séquence polypeptidique entre les acides aminés 1203 et 1549 (Figure 8).

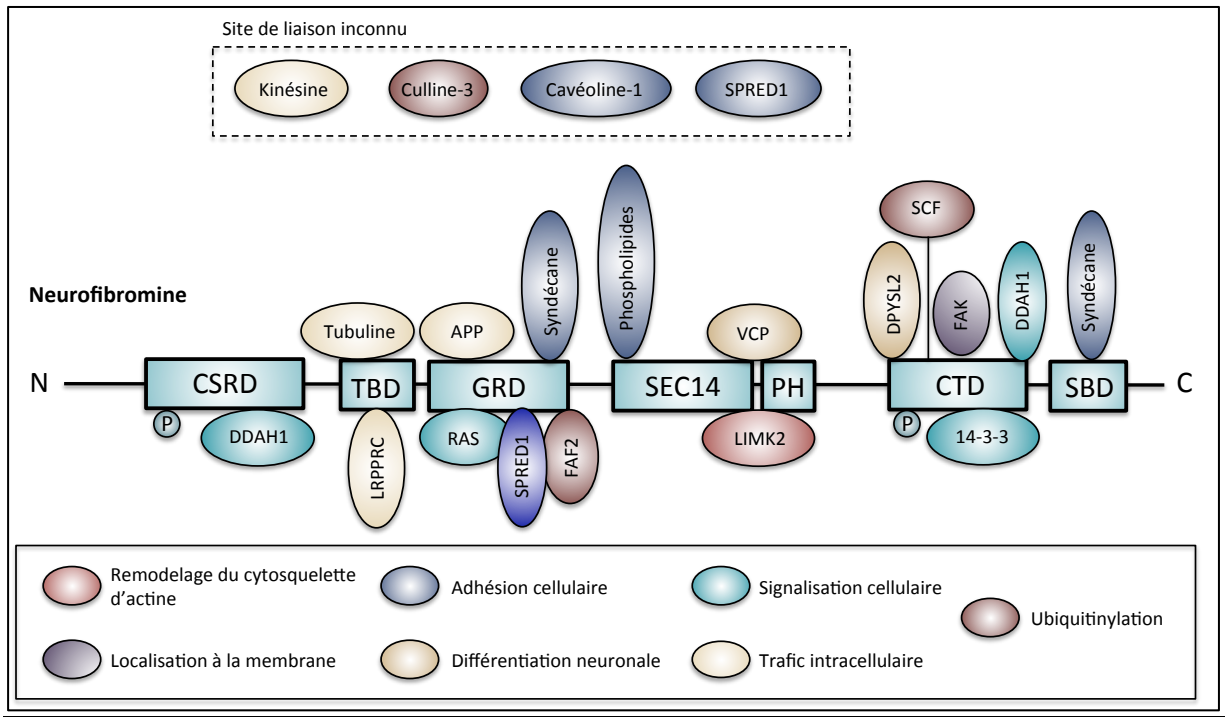


Figure 8. Structure protéique de la neurofibromine et partenaires protéiques connus.
Plusieurs domaines fonctionnels ont été identifiés au sein de la neurofibromine. Ils incluent un domaine riche en Cystéine-Sérine (CSRD), un domaine de liaison à la tubuline (TBD), un domaine central GAP-related (GRD), un domaine SEC14 (*SEC14p-like-lipid binding domain*), un domaine homologue de la pleckstrine (PH), un domaine carboxy-terminal (CTD) et un domaine de liaison aux syndécanes (SBD). Les domaines CSRD et CTD peuvent être phosphorylés et peuvent moduler l'activité RAS-GAP de la neurofibromine. De nombreux interacteurs de la neurofibromine ont été décrits. La liaison de ces interacteurs à la neurofibromine contrôle des processus cellulaires variés comme le remodelage du cytosquelette d'actine, la localisation à la membrane, l'adhésion cellulaire, la différenciation neuronale, la signalisation cellulaire, le trafic intracellulaire ou l'ubiquitylation. Le domaine de liaison de certain de ces interacteurs n'est pas encore identifié. Pour d'autres, la fonction de la liaison n'est pas encore parfaitement démontrée. Par exemple, la liaison de SPRED1 à la partie non-catalytique du domaine GRD a récemment été montrée (Hirata *et al.* 2016 ; Dunzendorfer-Matt *et al.* 2016). Cette liaison n'entrainerait pas d'interférence avec son activité GAP et pourrait être impliquée dans le recrutement de la neurofibromine à RAS. D'après Ratner *et al.* 2015.

Le domaine GRD de la neurofibromine stimule l'activité GTPasique intrinsèque des protéines RAS conduisant au clivage d'un phosphate du GTP lié aux RAS (Figure 3). La plupart des équipes travaillant sur la fonction suppresseur de tumeurs de la neurofibromine se sont concentrés sur le rôle du domaine GRD. Pourtant, des arguments existent pour penser que d'autres domaines de la neurofibromine contribuent aux fonctions suppressives de tumeurs. En effet, la plupart des protéines RAS-GAP ont une expression ubiquitaire et pourtant elles ne compensent pas la perte de la neurofibromine dans les tumeurs où *NF1* est inactivé. De plus, aucune inactivation de ces autres protéines RAS-GAP ne conduit à un syndrome de

prédisposition tumorale, indiquant que la perte de l'activité RAS-GAP n'est pas suffisante pour induire une transformation tumorale. En comparant les différences structurelles et fonctionnelles de la neurofibromine et des autres protéines RAS-GAP, il semble donc que l'association du GRD et des autres domaines de la neurofibromine soit nécessaire pour la fonction suppressive de tumeurs. De plus, des études biochimiques montrent que la reconstitution du domaine GRD dans les cellules de Schwann ne permet qu'une réversion partielle de la transformation tumorale des cellules, laissant supposer l'importance d'autres domaines (Thomas *et al.* 2006).

⇒ Modulation de l'activité RAS-GAP de la neurofibromine

D'autres domaines de la neurofibromine, le domaine riche en cystéines et sérines CSRD (*Cystein/Serine-Rich Domain*) et le domaine de liaison à la tubuline TBD (*Tubulin-Binding Domain*), localisés en N-terminal du domaine GRD, modulent son activité RAS-GAP dans des directions opposées. En effet, la phosphorylation du CSRD par la protéine kinase C-α (PKC) augmente l'activité RAS-GAP alors que l'interaction de la tubuline et du TBD inhibe la fonction RAS-GAP (Mangoura *et al.* 2006). La phosphorylation de la région C-terminale de la neurofibromine CTD (*C-Terminal Domain*) par la PKA augmenterait son association avec des protéines qui régulerait négativement son activité RAS-GAP (Feng *et al.* 2004).

Des interactions entre la partie non-catalytique du domaine GRD de la neurofibromine et SPRED1 ont été rapportées (Hirata *et al.* 2016 ; Dunzendorfer-Matt *et al*. 2016). Cette interaction est compatible avec la liaison de RAS et n'affecte pas l'activité catalytique RAS-GAP. SPRED1 est la protéine mutée dans le syndrome de Legius qui est une RASopathie (Brems *et al.* 2007). La liaison de SPRED1 induirait la localisation de NF1 à la membrane plasmique, favorisant ainsi son action sur RAS-GTP (Stowe *et al.* 2012 ; Dunzendorfer-Matt *et al*. 2016). Cette observation permet de relier la physiopathologie de la NF1 et du syndrome de Legius, deux pathologies qui présentent un recouvrement phénotypique important.

I-3.2. Neurofibromine et taux d'AMPc intracellulaire

Il a été proposé que les protéines *IRA1* et *IRA2,* homologues de *NF1* chez la levure, peuvent former un complexe avec l'adénylate cyclase et réguler le taux d'AMPc indépendamment de la voie de signalisation de RAS (Tanaka *et al.* 1989 ; Tanaka *et al.* 1990 ; Colombo *et al.* 2014). Des études réalisées chez la Drosophile montrent également que la neurofibromine peut stimuler la production d'AMPc par l'adénylate cyclase et ainsi activer les voies

effectrices en aval comme celles de la PKA (*Protein Kinase A*). La perte de fonction de la neurofibromine conduit alors à une diminution du taux d'AMPc intracellulaire ayant pour conséquences, un retard de croissance des mouches et des troubles d'apprentissage (Guo *et al.* 2000; The *et al.* 1997 ; Tong *et al.* 2002).
Chez les vertébrés, l'homéostasie du taux d'AMPc intracellulaire semble être très important pour le développement du système nerveux central. Des expériences chez le poisson-zèbre montrent l'implication de la neurofibromine, *via* son action sur le taux d'AMPc, dans les troubles d'apprentissage (Wolman *et al.* 2014). Chez les mammifères, une diminution du taux d'AMPc est observée dans les cellules neuronales et astrocytaires suite à l'inactivation du gène *NF1* et est associée à des anomalies du développement neuronal et des troubles d'apprentissage (Dasrupta *et al.* 2003 ; Brown *et al.* 2010, 2012 ; Hegedus *et al.* 2007).

D'autre part, le taux d'AMPc intracellulaire semble intervenir dans l'inhibition de la prolifération cellulaire et pourrait donc intervenir dans la tumorigénèse (Gold *et al*. 2013). Par exemple, l'étude de régions cérébrales montre une corrélation entre un taux faible d'AMPc et la formation de gliomes (Warrington *et al.* 2007). La suppression focale d'AMPc chez des souris *Nf1*-mutantes à l'état hétérozygote est suffisante pour induire la formation de gliomes (Warrington *et al.* 2010).

Cependant, le mécanisme par lequel la neurofibromine régule l'activité de l'adénylate cyclase et donc le taux d'AMPc reste fortement discuté. Des mécanismes dépendants et indépendants de RAS ont été décrits (Walker *et al.* 2006 ; Tong *et al.* 2002 ; Hegedus *et al.* 2007). Récemment, Anastasaki *et al.* ont proposé que, chez les mammifères, la régulation d'AMPc par la neurofibromine nécessitait bien l'activation de RAS mais mettait en jeu l'activation d'une protéine kinase atypique, la PKCζ (*Protein Kinase C Zeta*) (Anastasaki et Gutmann 2014)

Quoiqu'il en soit, des molécules thérapeutiques rétablissant l'homéostasie de l'AMPc ont été testées dans plusieurs modèles. Par exemple, chez le poisson-zèbre, l'augmentation pharmacologique d'AMPc restaure les fonctions d'apprentissage (Wolman *et al* 2014). L'élévation pharmacologique d'AMPc inhibe *in vivo* la croissance des gliomes chez des souris génétiquement modifiées pour *Nf1* (Warrington *et al.* 2010).

I-3.3. Autres fonctions de la neurofibromine indépendantes de RAS

Bien que de nombreux autres partenaires de liaison à la neurofibromine que RAS aient été identifiés, la signification physiologique des ces interactions protéines-protéines reste souvent à prouver (Caroll *et al.* 2012 pour revue, Tableau II et Figure 8). Parlons ici des interactions et fonctions, indépendantes de l'activité RAS-GAP de la neurofibromine, les plus fréquemment décrites.

- Liaison aux phospholipides

Un domaine bipartite contenant une région N-terminale SEC14, analogue à la protéine de levure Sec14p, et un domaine C-terminal PH (*Pleckstrine Homologous*), qui forme une interface de régulation, est présent en aval du domaine GRD. Chez la levure, Sec14p régule le trafic de lipides et de protéines intracellulaires (Mousley *et al.* 2006). De même, il a été montré que SEC14 est une région de liaison aux phospholipides, cette liaison étant modulée par le domaine PH (D'Angelo *et al.* 2006 ; Welti *et al.* 2007). Mais récemment, Welti *et al.* ont étudié les conséquences structurales et biochimiques des mutations tronquantes survenant dans le domaine SEC14-PH de la neurofibromine et n'ont observé aucune conséquence de ces mutations sur la liaison de phospholipides (Welti *et al.* 2011).

- Remodelage du cytosquelette d'actine et régulation de la motilité cellulaire

Plusieurs arguments indiquent que la neurofibromine est impliquée dans le remodelage du cytosquelette d'actine et dans la régulation de la motilité cellulaire. Ces fonctions pourraient avoir un rôle majeur dans la tumorigenèse. Il a d'abord été montré que la neurofibromine s'associait à l'actine après phosphorylation par la PKC (Li *et al*. 2001 ; Mangoura *et al*. 2006). D'autre part, la neurofibromine interagit avec la syndécane-2 pour favoriser la polymérisation d'actine et la formation de faisceaux (Hsueh *et al*. 2001 ; Lin *et al*. 2007). De plus, la région C-terminale de la neurofibromine CTD (*C-Terminal Domain*) contient un domaine d'interaction aux protéines FAK (*Focal Adhesion Kinase*) jouant un rôle notamment dans l'adhésion cellulaire (Kweh *et al.* 2009). La neurofibromine a aussi été décrite comme régulant négativement la voie RAC1/PAK1/LIMK1/cofiline indépendamment de l'activation de RAS. Cette voie est impliquée dans le remodelage des fibres d'actine. Enfin, il a été rapporté que LIMK2, une kinase de la voie Rho/ROCK/LIMK2/cofiline interagissait avec le domaine SEC14-PH. La voie Rho/ROCK/LIMK2/cofiline joue un rôle important dans la médiation de la polymérisation des filaments d'actine. L'interaction neurofibromine/LIMK2

inhibe l'activation de LIMK2 par ROCK et favorise ainsi la motilité cellulaire en remodelant le cytosquelette d'actine (Ozawa *et al*. 2005 ; Vallée *et al*. 2012).

- Synaptogenèse

La neurofibromine est abondamment exprimée dans différents compartiments cellulaires des neurones dont les synapses. Elle est la RAS-GAP principale des dendrites (Oliveira *et al.* 2014). Nous avons vu que la neurofibromine interagissait avec la syndécane-2 qui est un protéoglycane impliqué dans la régulation de la formation dendritique (Lin *et al.* 2007). D'autre part, la neurofibromine et la protéine contenant la valosine (VPC pour *Valosin-Containing Protein*) interagissent ensemble pour réguler la synaptogenèse et la formation de dendrites (Wang *et al.* 2011 ; Hsueh 2012).

Tableau II. Interacteurs de la neurofibromine et domaines d'interaction. Extrait de Ratner *et al.* 2015.

Catégorie de fonction	Interacteur	Fonction	Référence	Domaine de la neurofibromine
Trafic intracellulaire	LRPPRC	Trafic intracellulaire	Arun *et al.* 2013	TBD
	Kinésine-1	Transport vésiculaire ?	Hakimi *et al*. 2002	Inconnu
	APP	Transport du mélanosome ?	De Schepper *et al.* 2006	GRD
Interaction avec le cytosquelette	LIMK2	Sérine/thréonine kinase ; Remodelage du cytosquelette d'actine	Vallée *et al.* 2012	SEC14-PH
	Tubuline	Microtubules ; inhibition de l'activité RAS-GAP	Bollag *et al.* 1993	TBD
Différenciation neuronale	VCP	Formation dendritique	Wang *et al.* 2011	SEC14-PH
	CRMP-2	Excroissance neuronale	Patrakitkomjorn *et al.* 2008	CTD
Adhésion cellulaire	FAK	Adhésion cellulaire	Kweh *et al.* 2009	CTD
Ubiquitinylation	ETEA	Protéine UBA/UBX	Phan *et al.* 2010	GRD
	SAG/CUL1/FBXW7	Complexe ubiquitine-ligase SFC E3 ; Ubiquitinylation	Tan *et al.* 2011	CTD
	Culline 3	Complexe ubiquitine-ligase E3 ; Ubiquitinylation	Hollstein et Cichowski, 2013	Protéine entière
Localisation à la membrane	Phospholipides	Localisation à la membrane ?	Welti *et al* . 2007	SEC14-PH
	Cavéoline-1	Localisation et signalisation RAS/FAK/AKT	Boyanapalli *et al.* 2006	Protéine entière
	Syndécane	Protéoglycane héparane-sulfate	Hsueh *et al.* 2001	GRD SBD ?
Signalisation	DDAH	Régulateur NO/NOS	Tokuo *et al.* 2001	CTD et CSRD

cellulaire	14-3-3	Régulation négative de l'activité RAS-GAP	Feng *et al.* 2004	CTD
	RAS	Signalisation	Ballester *et al.* 1990 ; Martin *et al.* 1990 ; Xu *et al.* 1990	GRD
	SPRED1	Diminution de l'activité RAS-GAP	Stowe *et al.* 2012	Inconnu

I-4. Le gène *NF1*

La neurofibromatose de type 1 est causée par des mutations constitutionnelles hétérozygotes perte de fonction du gène *NF1* localisé en 17q11.2.

Le gène *NF1* est particulièrement grand : il s'étend sur 280 kb et contient 60 exons. *NF1* possède quatre exons alternatifs : les exons 9a, 10a-2, 23a et 48a dont la rétention ne modifie pas le cadre de lecture. Plusieurs transcrits alternatifs de *NF1* ont été décrits au sein de divers tissus normaux. Un transcrit alternatif incluant l'exon 48a et présentant une insertion en phase de 54 pb, est abondamment exprimé dans le muscle alors qu'un autre incluant l'exon 9a (30 pb en phase) est très exprimé dans le système nerveux central. Un grand nombre de transcrits de tailles variables résultant pour la plupart de la délétion d'un exon (exons 4b, 29, 30, 33, 37, 43 et 45) a également été décrit dans la littérature. Par ailleurs, il a été proposé que les différences quantitatives d'expression entre les types de transcrits de *NF1* pourraient contribuer à l'expressivité variable de la neurofibromatose de type 1 (Vandenbroucke *et al.* 2002).

I-4.1. Altérations constitutionnelles du gène *NF1*

⇒ Mutations intragéniques

Plus de 90 % des patients atteints de NF1 portent une mutation constitutionnelle restreinte au gène *NF1*. Les mutations affectant *NF1* se répartissent sur l'ensemble du gène et il n'est pas retrouvé de points chauds de mutations (Messiaen *et al.* 2000). Tous les types de mutations sont observés : mutations non-sens, faux-sens ou d'épissage, décalage du cadre de lecture, délétions/duplications en phase d'un ou plusieurs codons, délétions/duplications d'un ou plusieurs exons et délétions de l'ensemble du gène.

⇒ Microdélétions

Environ 5 à 10% des patients atteints de NF1 présentent une délétion germinale de plus d'1 Mb du *locus NF1* en 17q11.2, incluant l'ensemble du gène *NF1* ainsi que 14 gènes adjacents (Figure 9 ; Tableau III). La plupart de ces délétions ne sont pas détectables d'un point de vue cytogénétique et sont donc appelées microdélétions.

L'architecture génomique de la région 17q11.2 est caractérisée par la présence de duplications segmentaires qui serait responsable des réarrangements génétiques dans cette région par un mécanisme de recombinaison homologue non allélique (*Non Allelic Homologous Recombination,* NAHR) (Dorschner *et al.* 2000, Forbes *et al.* 2004). Grâce aux récents progrès des techniques de génétique moléculaire telle que la CGH (*Comparative Genomic Hybridization*)-*array*, plusieurs types de microdélétions récurrentes du *locus NF1* et leurs points de cassure ont été identifiés (Pasmant *et al.* 2010). Certaines sont dues à des recombinaisons entre *NF1-REP-a* et *–c* (microdélétions de type 1 ; Figure 9) ou *NF1-REP-b* et *–c* (microdélétions de type 3 ; Figure 9), d'autres, entre le gène *SUZ12 (SUppressor of Zeste 12 homolog Drosophila)* et son pseudogène *SUZ12P* (microdélétions de type 2 ; Figure 9). Le gène *SUZ12* comporte 16 exons et est situé à 41 kb de l'extrémité centromérique de *NF1-REP-c*. Le pseudogène *SUZ12P* incluant les exons 1 à 9 de *SUZ12* est localisé sur le versant télomérique de *NF1-REP-a* (à 4 kb) en orientation directe avec *SUZ12* (Mussotter *et al.* 2014). Un segment de 46 kb commun à *SUZ12* et *SUZ12P* présente une identité de séquences d'environ 97% (Steinmann *et al.* 2007).

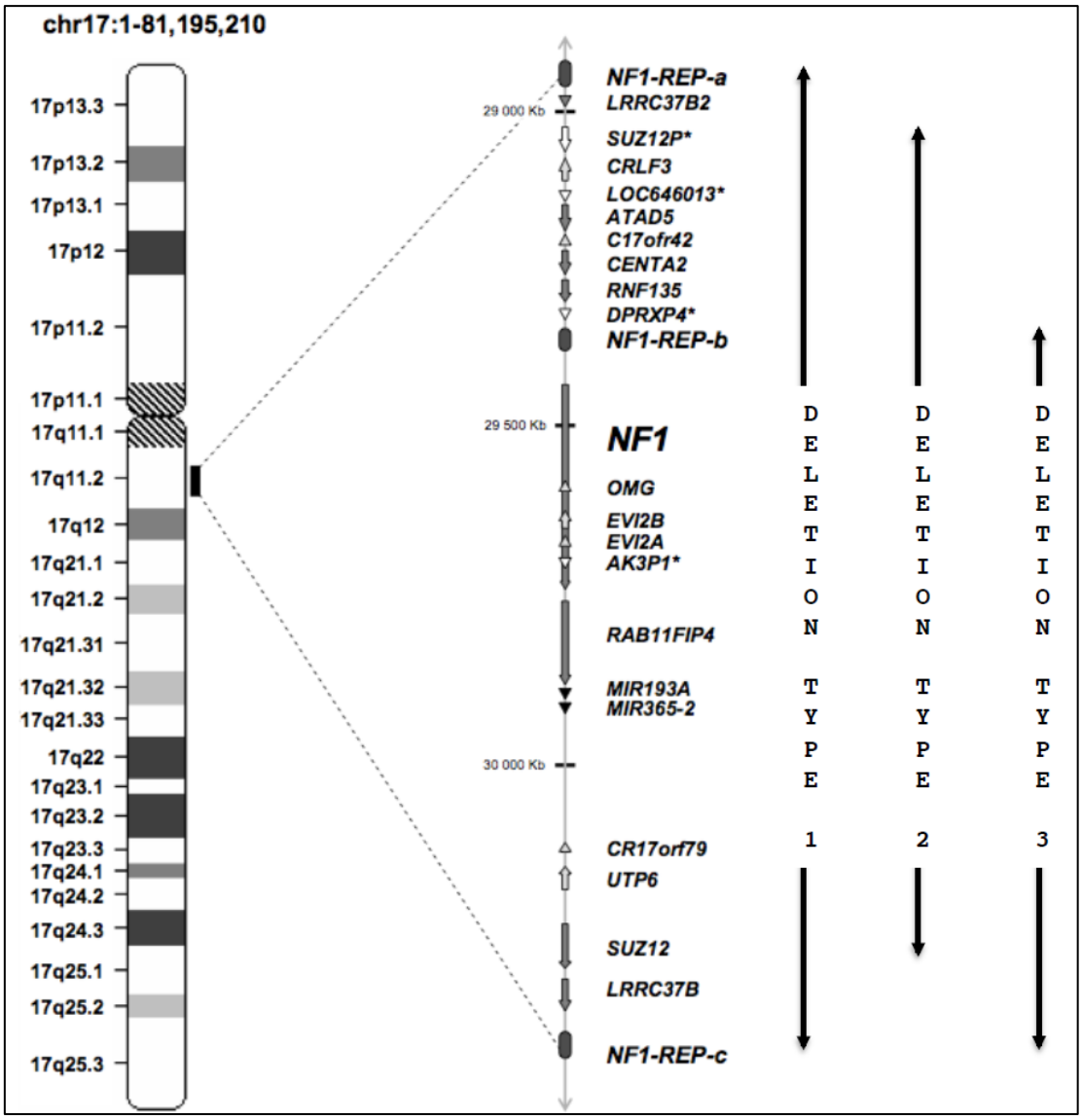


Figure 9. Représentation schématique du *locus NF1* 17q11.2 et des microdélétions *NF1*.
La délétion de type 1, d'environ 1,4 Mb, emporte 15 gènes, 4 pseudogènes (identifiés par une étoile) et 2 microARNs. La délétion de type 2 fait environ 1,2 Mb et la délétion de type 3 fait environ 1,0 Mb. Adapté d'après Pasmant *et al*. 2010.

Tableau III. Liste des 15 gènes emportés dans la plus grande microdélétion *NF1*: la microdélétion de type 1 .

Gènes[a]	Nom	Numéro *Genbank*	Localisation sur le chr. 17 (en kb)	Fonction
LRRC37B2 (DKFZp667M2411)	*Leucine Rich Repeat Containing 37, member B2*	NM_207323	25 959 – 25 966	Fonction inconnue
CRLF3	*Cytokine Receptor-Like Factor 3*	NM_015986	26 175 – 26 133	Une expression augmentée a été retrouvée dans certains carcinomes cutanés
ATAD5 (C17orf41)	*ATPase family, AAA Domain containing 5*	NM_024857	26 183 – 26 246	Peut lier RAD9. ATAD5 est impliqué dans la voie de BCL12 et de l'apoptose induite par des lésions de l'ADN
C17orf42	*Chromosome 17 open reading frame 42*	NM_024683	26 257 – 26 250	Fonction inconnue
CENTA2=	*CENTaurin, Alpha 2=*	NM_018404	26 273	Active ARF6 *via* son activité GAP

ADAP2	*ArfGAP with Dual PH domains 2*		– 26 310	
RNF135	*RiNg Finger protein 135*	NM_032322	26 322 – 26 351	Impliqué dans la croissance cellulaire. Son haploinsuffisance par mutations germinales cause un syndrome d'excès de croissance
NF1	*Neurofibromin 1*	NM_000267	26 446 – 26 725	
OMG	*Oligodendrocyte Myelin Glycoprotein*	NM_002544	26 648 – 26 645	Fortement exprimé dans le système nerveux central. La protéine OMG interagit avec les récepteurs NOGO
EVI2B	*Ecotropic Viral Integration site 2B*	NM_006495	26 665 – 26 654	Protéine membranaire fortement exprimée dans la moelle, la rate et le thymus et de manière augmentée dans la leucémie lymphoïde chronique
EVI2A	*Ecotropic Viral Integration site 2A*	NM_014210	26 672 – 26 668	Même profil d'expression que *EVI2A* avec une forte expression cérébrale. Son expression augmente dans certaines hémopathies myéloïdes
RAB11FIP4	*RAB11 Family Interacting Protein 4 (class II)*	NM_032932	26 742 – 26 889	Forte expression cérébrale. Joue un rôle dans l'adressage des endosomes
C17orf79	*Chromosome 17 open reading frame 79*	NM_018405	27 210 – 27 203	Fonction inconnue
UTP6	*Small subunit (SSU) processome component*	NM_018428	27 252 – 27 214	Expression augmentée dans certains carcinomes hépato cellulaires
SUZ12	*SUppressor of Zeste 12 homolog (Drosophila)*	NM_015355	27 288 – 27 352	Fait partie du groupe Polycomb qui possède des rôles essentiels au développement et à l'embryogenèse. Rôle majeur dans tumorigenèse
LRRC37B	*Leucine Rich Repeat Containing 37B*	NM_052888	27 372 – 27 404	Fonction inconnue

I-4.2. Altérations somatiques du gène *NF1* dans les tumeurs survenant dans le cadre de la neurofibromatose de type 1

Selon le modèle de Knudson, les neurofibromes se développent quand une altération somatique inactive l'allèle sauvage du gène *NF1* au sein des cellules de Schwann. Les connaissances concernant les altérations somatiques du gène *NF1* ont récemment progressé avec le développement de nouvelles méthodes de CGH-*array* et de séquençage haut débit (Pasmant *et al.* 2015). Plusieurs types d'altérations moléculaires sont responsables de l'inactivation du second allèle au sein des tumeurs : des mutations intragéniques et des LOH (*Loss Of Heterozygosity)*. Les LOH incluent des délétions partielles d'un chromosome, des isodisomies segmentaires par recombinaisons mitotiques et des pertes d'un chromosome suivies ou non de reduplication. La présence des duplications segmentaires serait responsable des réarrangements génétiques fréquent dans cette région.

⇒ **Neurofibromes**

Un second événement d'inactivation de *NF1*, de type mutation intragénique, est plus fréquemment retrouvé que les LOH dans les neurofibromes cutanés (Thomas *et al.* 2010).

⇒ MPNST

L'inactivation du second allèle de *NF1* est également décrite dans 80 à 90% des MPNST (Upadhyaya *et al.* 2008, Pasmant *et al.* 2014). Le spectre des mutations somatiques diffère notablement de celui des neurofibromes avec la présence importante de microdélétions *NF1*. Cette observation semble être le reflet de mécanismes moléculaires différents à l'origine du second événement d'inactivation de *NF1*. Ces délétions pourraient refléter l'instabilité chromosomique du génome, documentée dans de nombreux sarcomes ou bien cibler un autre gène du chromosome 17, situé à proximité du *locus NF1*.

I-4.3. Mutations du gène *NF1* dans les tumeurs sporadiques

Avec les récents projets de séquençage de génomes des cancers, des altérations somatiques du gène *NF1* ont été rapportées de plus en plus fréquemment au sein de plusieurs types tumoraux, hors du cadre de la neurofibromatose de type 1. Plusieurs études analysant les profils de mutations somatiques pan-cancer retrouvent le gène *NF1* comme l'un des gènes les plus fréquemment mutés. Le gène suppresseur de tumeur *NF1* a donc un rôle majeur en cancérologie. Par exemple, le travail de Tan *et al.,* consistant en l'analyse systématique de mutations non synonymes extraites de la base de données COSMIC (*Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer*) impliquant plus de 8000 échantillons parmi 23 types de cancers différents, identifie *NF1* comme l'un des 50 gènes les plus fréquemment mutés (Tan *et al.* 2015). Une autre étude analysant le profil de mutations somatiques de plus de 1500 gènes liés au cancer dans un large panel de tumeurs du sein, du poumon, de l'ovaire, du pancréas et de la prostate a identifié *NF1* comme l'un des gènes les plus fréquemment mutés dans ces types de tumeurs avec une fréquence de mutations supérieure à 5% (Kan *et al.* 2010).

L'analyse des données génomiques de plusieurs milliers d'échantillons tumoraux provenant de 126 études différentes, via le portail d'exploration interactive cBioPortal for Cancer Genomics permet d'identifier les types de cancers où *NF1* est le plus fréquemment muté. Ainsi, des mutations ponctuelles et des délétions de *NF1* ont été décrites dans les mélanomes (45% de mutations dans les mélanomes desmoplastiques et 13-14% dans les mélanomes cutanés), les glioblastomes (14-18%), les cancers du poumon (15%), les cancers de la vessie (14%), les cancers de l'utérus (14%) (Figure 10) (Gao *et al.* 2013 ; Cerami *et al.* 2012, Nissan

et al. 2014) … Avec 40% de tumeurs mutées, les MPNST sont à ce jour le deuxième type de cancers où *NF1* est le plus fréquemment muté.

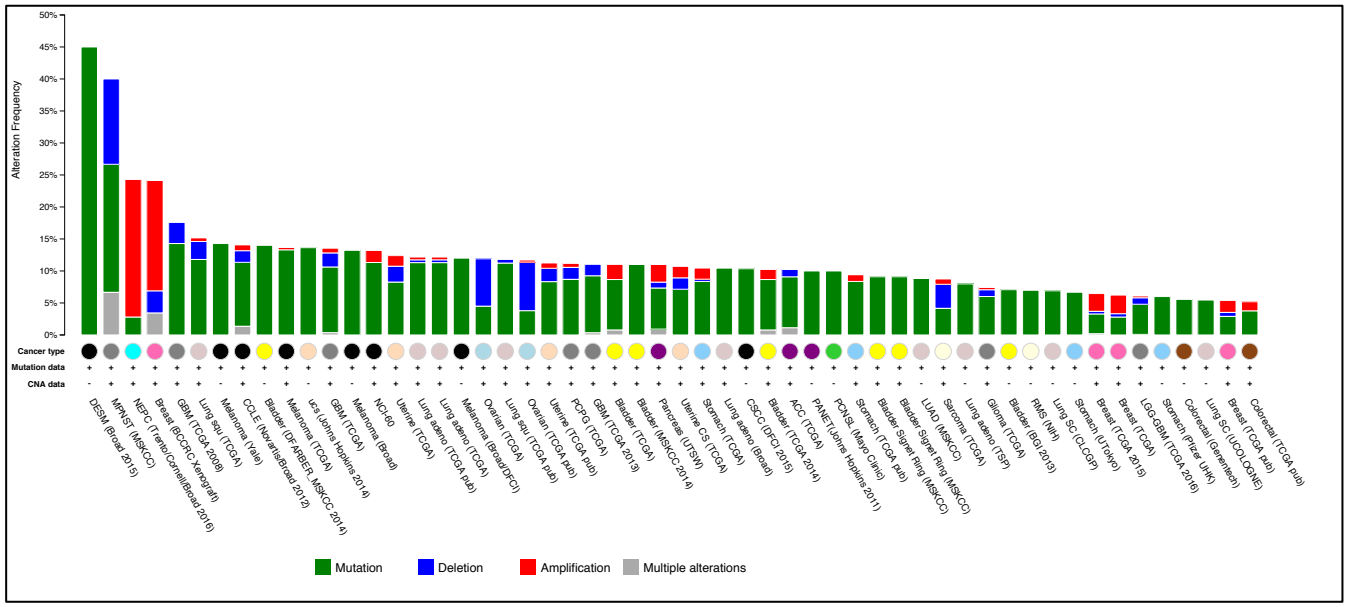


Figure 10. Fréquence des altérations somatiques du gène *NF1* dans les tumeurs sporadiques humaines. (Source : The cBio Cancer genomics Portal : http.cbioportal.org) Seules les tumeurs présentant une mutation de *NF1* dans plus de 5% des cas sont représentées. Voici le détail des dix premières études (en excluant les deux études pour lesquelles des amplifications de NF1 sont majoritairement retrouvées) :

Abréviation de la tumeur étudiée	Nom complet	Pourcentage de tumeurs mutées *NF1*	Nombre de cas de l'étude	Source
DESM	*DESmoplastic Melanoma*	45%	20	Broad 2015
MPNST	*Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumor*	40%	15	Lee *et al.* 2014
GBM	*Glioblastoma*	17.6%	91	TCGA, Nature 2008
Lung squ	*Lung Squamous Cell Carcinoma*	15.2%	178	TCGA, Provisional
Melanoma	*Skin Cutaneous Melanoma*	14.3%	91	Krauthammer *et al.* 2012
Bladder	*Bladder Urothelial Carcinoma*	14%	50	Van Allen *et al.* 2014
Melanoma	*Skin Cutaneous Melanoma*	13.7%	278	TCGA, Provisional
Ucs	*Uterine Carcinosarcoma*	13.6%	22	Jones *et al.* 2014
GBM	*Glioblastoma Multiforme*	13.6%	273	TCGA, Provisional
Melanoma	*Skin Cutaneous Melanoma*	13.2%	121	Hodis *et al.* 2012

Le gène *NF1* étant un gène suppresseur de tumeurs, les mutations se répartissent tout le long du gène sans que des points chauds de mutations n'aient été retrouvés. Dans les MPNST, la perte de fonction de la neurofibromine résulte de mutations sur chacun des deux allèles de *NF1*. Il n'est actuellement pas connu si l'inactivation biallèlique de *NF1* est fréquente dans les autres types de tumeurs ou si une mutation hétérozygote suffit dans la contribution à la progression tumorale. Par exemple, l'analyse sur cBioPortal des 278 échantillons de mélanomes cutanés du TCGA (*The Cancer Genome Atlas*) révèle que parmi les 90 échantillons mutés *NF1* (32% de mutations *NF1*), seuls 16 (18%) présentent une inactivation biallèlique (Figure 11). Cependant, alors que les mutations des gènes *NRAS* et *BRAF* sont clairement mutuellement exclusives, 77% des mélanomes mutés *NF1* portent aussi une mutation dans *NRAS* ou *BRAF*. La possible coopération des mutations de *NF1* et *BRAF* dans la mélanogénèse a d'ailleurs récemment été étudiée (Maertens *et al.* 2013).

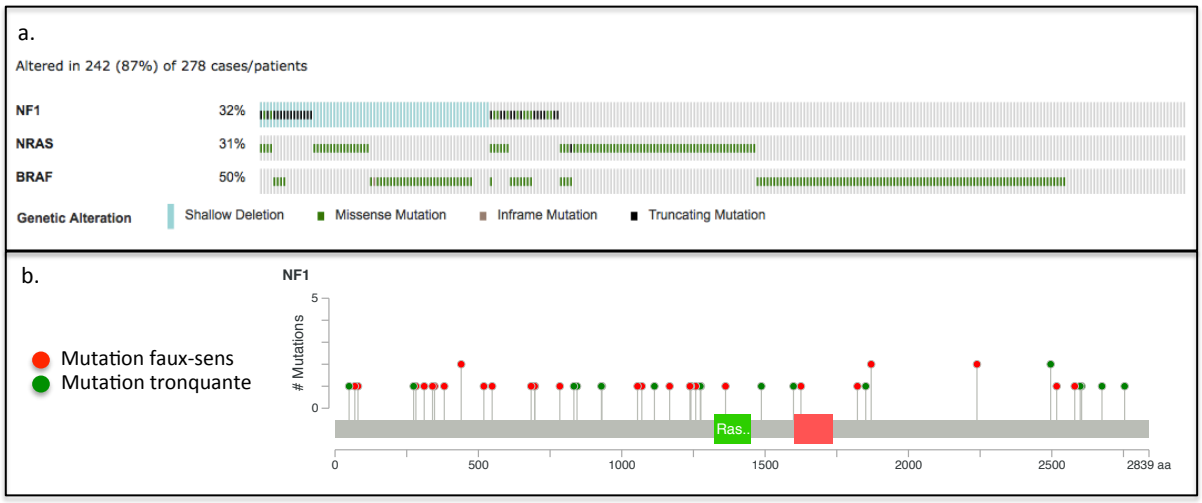


Figure 11. Analyse des mutations de *NF1*, *NRAS* et *BRAF* dans 278 mélanomes cutanés du TCGA grâce à l'interface en ligne cBioPortal.
a. Des mutations de *NF1* sont retrouvées dans 32%, *NRAS* 31% et *BRAF* 50% des mélanomes étudiés. b. Les mutations de *NF1* sont reparties tout le long du gène, sans point chaud.

L'importance de l'ordre de survenue des mutations peut expliquer pourquoi les patients atteints de neurofibromatose de type 1 ne sont pas prédisposés à développer certaines tumeurs sporadiques comme le cancer du poumon alors que plus de 15% des cancers du poumon sporadiques ont une mutation de NF1. Cette mutation doit probablement être acquise plus tard dans la tumorigenèse.

II- CHAPITRE 2. Du neurofibrome plexiforme au MPNST

Les MPNST sont des tumeurs particulièrement agressives au pronostic vital très défavorable. La survenue de MPNST chez un patient NF1 représente la première cause de mortalité de ces patients. Mes travaux de thèse ont porté sur l'étude de la transformation maligne d'un neurofibrome plexiforme en MPNST. Voici donc une revue de l'état des connaissances actuelles sur les neurofibromes plexiformes, les MPNST et le processus de tumorigenèse.

II-1. Le neurofibrome plexiforme

II-1.1. Composition et cellules d'origine d'un neurofibrome plexiforme

II-1.1.a) Caractéristiques anatomo-pathologiques et immunohistochimiques d'un neurofibrome plexiforme

Les neurofibromes plexiformes sont des tumeurs bénignes des gaines des nerfs périphériques et sont histologiquement complexes. Ils sont typiquement localisés dans un tronc nerveux et sont définis par l'implication de plusieurs fascicules des nerfs adjacents ou de multiples composants du plexus nerveux (Figure 12 ; Figure 13) (Rodriguez *et al.* 2012). L'examen microscopique de sections tumorales montre des lésions modérément hyper-cellulaires constituées majoritairement de cellules de Schwann, fusiformes ou allongées à cytoplasme peu abondant, entre-chassées dans une matrice de mucopolysaccharides et de collagène (Figure 12). Entre 40 et 80% des cellules du neurofibromes ont un marquage positif pour les marqueurs de cellules de Schwann S100β ou $p75^{NTR}$ (Figure 12). Les cellules négatives pour ces marqueurs sont un mélange de fibroblastes, de mastocytes, de cellules vasculaires, de cellules périneuriales, de macrophages et d'une population de cellules immuno-réactive CD34+ (Caroll *et al.* 2012).

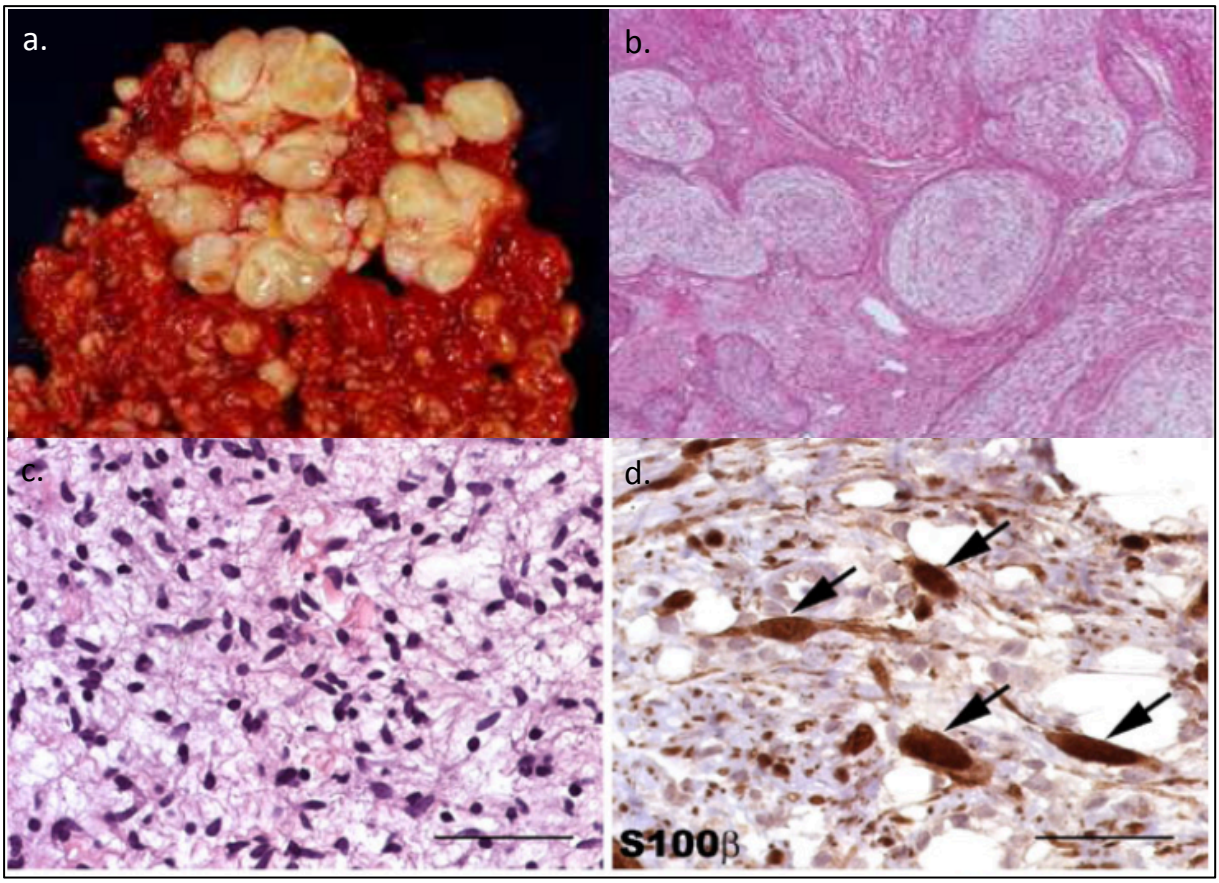


Figure 12. Analyse anatomo-pathologique de neurofibromes.
a. Les neurofibromes plexiformes forment typiquement de larges masses multinodulaires. b. L'implication et l'expansion de plusieurs fascicules de nerfs périphériques définissent les neurofibromes plexiformes. c. Section d'un neurofibrome plexiforme, marquée à l'hématoxyline et l'éosine montrant des cellules fusiformes entre-chassées dans une matrice myxoide typique de ces lésions. d. Une analyse immunohistochimique d'une coupe de neurofibrome plexiforme montre un marquage de la majorité des cellules avec le marqueur S100β, caractéristique des cellules de Schwann différenciées. Extrait de Rodriguez *et al.* 2013 et Caroll *et al.* 2012.

Le diagnostic différentiel des neurofibromes plexiformes est vaste et est influencé par le site d'occurrence. Il inclut des lésions nerveuses néoplasiques et non-néoplasiques comme les Schwannomes, les myxomes des gaines nerveuses et un certain nombre de tumeurs n'impliquant pas la gaine des nerfs (Rodriguez *et al.* 2012).

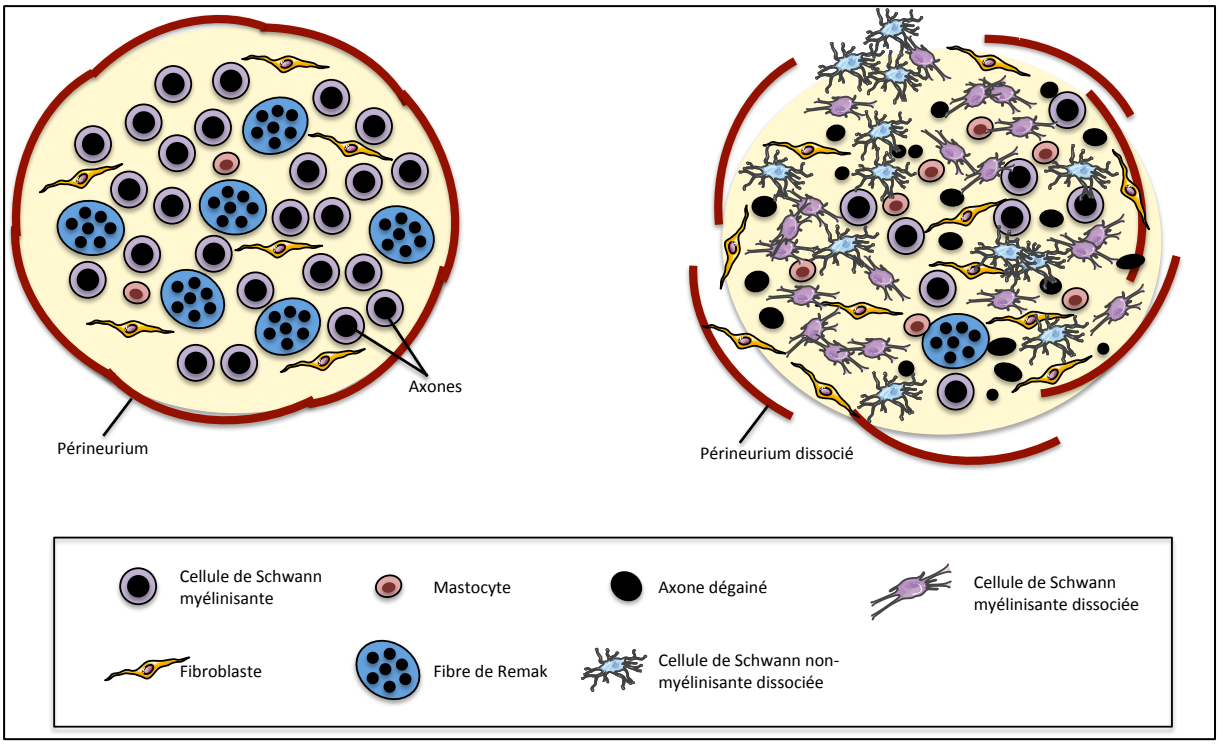


Figure 13. Schéma d'un fascicule nerveux à l'état physiologique et d'un neurofibrome.
Pour plus de clarté, un seul fascicule nerveux est représenté. A l'état physiologique, un fascicule nerveux se compose principalement de cellules de Schwann myélinisantes entourant chacune un axone de gros diamètre, de fibroblastes, de mastocytes et de fibres de Remak constituées d'axones de petits diamètres engainés par une cellule de Schwann. Dans le neurofibrome, la structure du fascicule nerveux est désorganisée. Les fibres de Remak sont majoritairement dissociées alors que les axones myélinisés restent relativement épargnés. D'après Parinello *et al.* 2009.

II-1.1.b) Cellules à l'origine des neurofibromes plexiformes

⇒ Cellules du lignage Schwann

Il a été suggéré que les neurofibromes plexiformes sont des tumeurs congénitales survenant dans une cellule souche ou un progéniteur pendant le développement du nerf (Riccardi *et al.* 1992). La cellule de Schwann est la cellule d'origine des neurofibromes plexiformes puisque, dans les tumeurs, elle présente une inactivation biallèlique de *NF1* conduisant à une perte de fonction de la neurofibromine et à l'hyperactivation de RAS dans ces cellules. Cependant, le stade précis du développement, et donc le type cellulaire spécifique du lignage de la cellule de Schwann dans lequel a lieu cette inactivation, est sujet à débat.

Le lignage de la cellule de Schwann est bien caractérisé. Au cours de leur différentiation, les cellules du lignage Schwann ont un profil d'expression génique qui évolue dans le temps (Figure 14) (Jessen *et al.* 2005). Ainsi, un ensemble de marqueurs moléculaires partiellement chevauchant peut servir à caractériser chaque stade du lignage de la cellule de Schwann et à adresser *in vivo* la question du type cellulaire d'origine des neurofibromes.

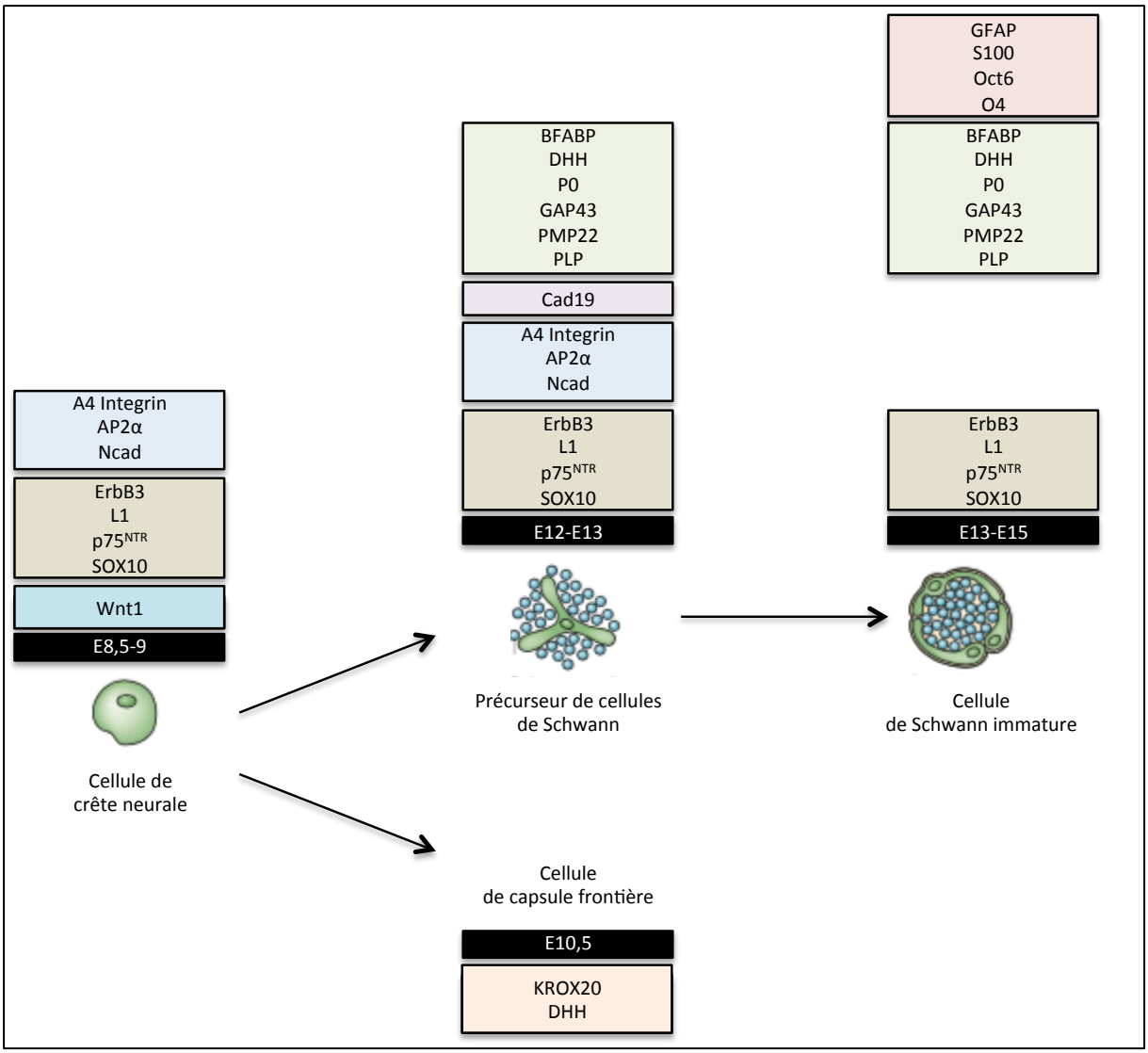


Figure 14. Profil d'expression des cellules précurseurs des cellules de Schwann.
Un certain nombre de marqueurs de chacun des différents stades de différenciation de la cellule de crête neural jusqu'à la cellule de Schwann immature ont été décrits. Un recouvrement de l'expression de plusieurs de ces marqueurs est observé au cours de la différenciation. D'après Jessen *et al.* 2005 et Caroll *et al.* 2012.

La cellule de Schwann dérive de cellules de crêtes neurales. Ces dernières se différencient en précurseurs de cellules de Schwann entre E12 et E13 chez la souris puis en cellules de Schwann immatures entre E13 et E15. Le destin postnatal des cellules de Schwann immatures est déterminé par l'axone avec lequel elles sont aléatoirement associées : elles peuvent devenir des cellules de Schwann matures myélinisantes et ne protéger qu'un seul axone de grand diamètre, ou alors devenir des cellules de Schwann non myélinisantes et entourer plusieurs axones de faible diamètre. Ce choix est guidé par le diamètre des axones avec lesquels elles sont en contact (Fawcett et Keynes. 1990).

⇒ Cellules des capsules frontières

Au sein du système nerveux périphériques, les crêtes neurales génèrent un autre type de dérivés : les cellules des capsules frontières (Figure 15). La cellule des capsules frontières est une cellule gliale formant des clusters localisés dans les racines des nerfs, tout le long du tube neural : ces clusters sont appelés capsule frontière. Les cellules des capsules frontières sont localisées à l'interface entre le système nerveux central et le système nerveux périphérique, au niveau des entrées des axones des neurones sensoriels et des sorties des axones des motoneurones. Elles jouent un rôle important dans le développement et le maintien de la frontière entre le système nerveux central et le système nerveux périphérique. Elles assurent, en effet, le maintien des corps des motoneurones dans le tube neural. De plus, elles participent à la mise en place de certaines populations de cellules de la périphérie. En effet, elles migrent le long des racines des nerfs périphériques jusqu'aux ganglions sensoriels. Le long des racines, elles se différencient en cellule de Schwann. Dans les ganglions, elles se différentient en cellules gliales satellites d'une part et en neurones proprioceptifs d'autre part (Figure 15). Ainsi, les cellules des capsules frontières représentent une population de cellules potentiellement pluripotentes qui constitue un réservoir de cellules souches neurales (Topilko *et al.* 2007).

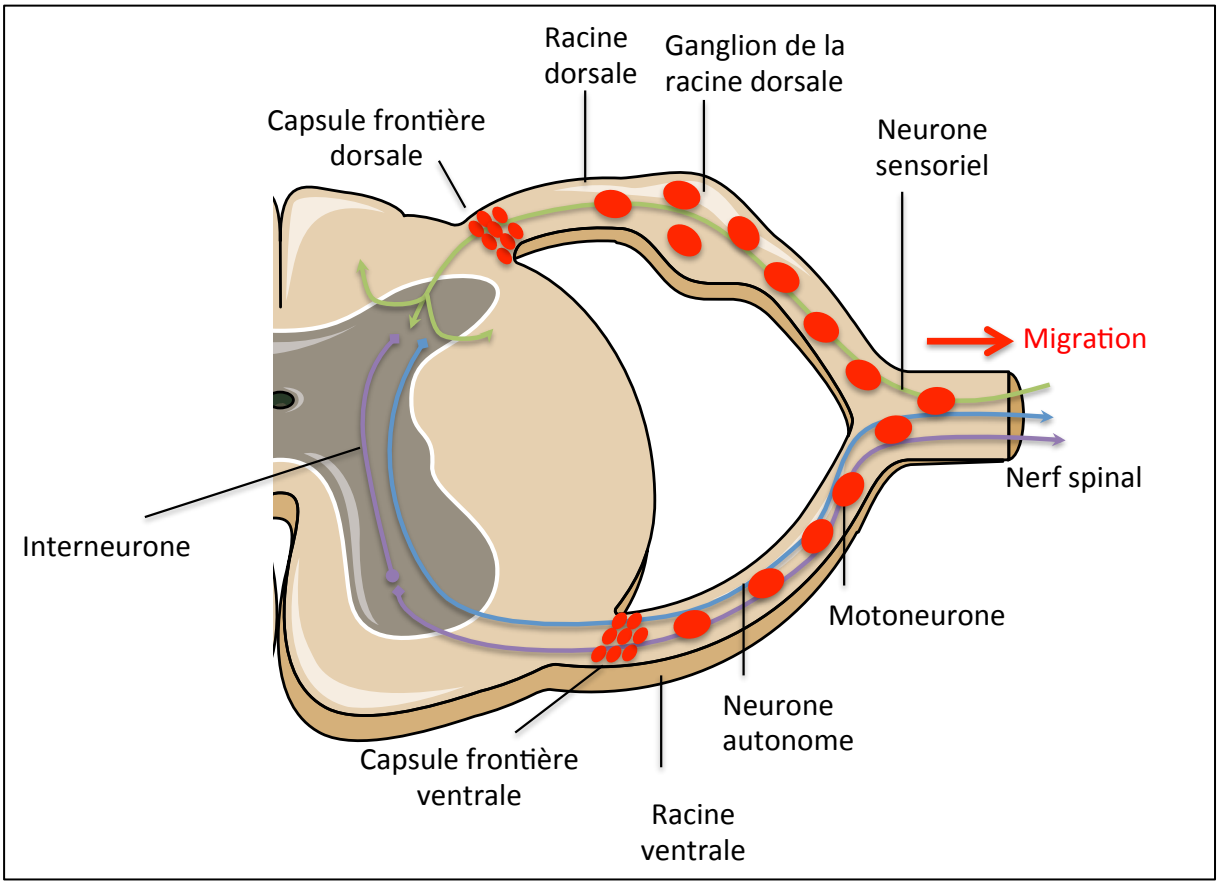


Figure 15. Capsule frontière.

Les cellules des capsules frontières sont localisées au niveau des entrées des axones des neurones sensoriels (en vert) et des sorties des axones des motoneurones (en violet). Elles migrent le long des racines des nerfs périphériques. Au cours de cette migration, elles se différencient en cellule de Schwann. Dans les ganglions, elles se différentient en cellules gliales satellites d'une part et en neurones proprioceptifs d'autre part.
Extrait de Gresset *et al.* 2015.

II-1.2. Modèles murins de neurofibromes plexiformes

La génération de modèles murins a beaucoup étendu la compréhension de l'origine des neurofibromes.

La protéine orthologue de la souris possède 98% d'identité de séquence avec la neurofibromine humaine. Un modèle murin hétérozygote *Nf1*$^{\Delta 31/+}$ a été obtenu par deux équipes indépendantes en 1994 (Brannan *et al.* 1994 ; Jacks *et al.* 1994). De façon surprenante, ces souris viables et fertiles ne montraient que de rares symptômes de NF1 comme des leucémies ou des phéochromocytomes mais ne développaient pas de neurofibromes. Pour l'expliquer, il fut proposé qu'étant donné le temps de gestation et la durée de vie réduits ainsi que le compartiment réduit de dérivés de crêtes neurales, la probabilité de survenue du second hit de mutation *Nf1* était réduite chez la souris. Malheureusement, les souris Nf1$^{\Delta 31/\Delta 31}$ homozygotes pour cette mutation meurent au 13,5^{ème} jour de développement embryonnaire (E13,5) suite à des anomalies cardiaques et présentent des anomalies musculaires, rénales et hépatiques et très peu d'atteintes du système nerveux.

Cichowki *et al.* ont exploré l'hypothèse de la fonction suppresseur de tumeurs de *Nf1* et le fait que la perte de fonction de *Nf1* précédait la formation tumorale (Cichowski *et al*. 1999). Cette équipe a injecté des cellules souches embryonnaires *Nf1*$^{-/-}$ dans des blastocystes sauvages, créant ainsi des souris chimères. Les souris développaient des neurofibromes dérivant des cellules souches *Nf1*$^{-/-}$, suggérant ainsi la dépendance tumorale à l'inactivation de *Nf1*. Cependant, le degré de chimérisme dans ce modèle survenait aléatoirement et ne pouvait pas être contrôlé génétiquement. Avec ce modèle, il demeurait difficile d'établir précisément la cellule d'origine du neurofibrome et les conditions pour le développement tumoral.

Plusieurs groupes indépendants ont alors recherché la cellule d'origine des neurofibromes en générant des modèles murins transgéniques conditionnels dans lesquels la perte de fonction bi-allélique de *Nf1* était induite spécifiquement dans des cellules du lignage de Schwann à différentes périodes du développement embryonnaire. Cette inactivation localisée pouvait être

induite par une Cre-recombinase placée en aval d'un promoteur exprimé spécifiquement dans certaines cellules du lignage Schwann (Figure 14).

La perte de fonction de *Nf1* spécifiquement dans les cellules souches de crête neurale (CSCN) chez des souris *Wnt1*-Cre à E9,5 n'induit pas la formation de neurofibrome (Gitler *et al.* 2003). De plus, les CSCN n'acquièrent pas de caractéristique de cellules tumorigènes lors de l'inactivation de *Nf1* (Joseph *et al.* 2008). Ces études permettent donc d'écarter les CSCN comme type cellulaire à l'origine des neurofibromes et de focaliser les travaux sur les cellules plus tardives du lignage de Schwann (Figure 14).

La perte de fonction de *Nf1* à E12,5, dans les précurseurs de cellules de Schwann et cellules de Schwann immatures, sous le contrôle du promoteur *P0* (aussi connu sous le nom de *Mpz* pour *Myelin Protein P0*) (souris *P0*-Cre;*Nf1*$^{flox/-}$) résulte en un développement de neurofibromes plexiformes dans les troncs nerveux périphériques (Zheng *et al.* 2008). Cette fenêtre d'inactivation correspond à celle proposé par Wu *et al.* qui réalisent une inactivation de *Nf1* à E12,5 sous le contrôle du promoteur *Dhh* (*Desert HedgeHog*) (souris *Dhh*-Cre;Nf1$^{flox/flox}$) (Wu *et al.* 2008). Le gène *Dhh* est exprimé dans les précurseurs des cellules de Schwann et dans les cellules des capsules frontières. La perte de fonction de *Nf1* à E12,5 dans ces cellules est suffisante pour le développement de neurofibromes cutanés et plexiformes dans les racines des nerfs périphériques et seulement une hyperplasie dans les troncs nerveux. Enfin, quand *Nf1* est inactivé plus tardivement, à E15,5 dans les cellules de Schwann immatures, (souris *Krox20*-Cre;*Nf1*$^{flox/-}$), les souris développent des neurofibromes plexiformes dans les racines dorsales des nerfs et dans les nerfs crâniens mais pas dans les nerfs périphériques (Zhu *et al.* 2002). Il semble donc que le moment d'inactivation de la neurofibromine soit un évènement déterminant dans la localisation de la formation de neurofibromes dans les nerfs périphériques.

Il est également possible que ces données permettent de comprendre la variabilité très importante de la sévérité de la NF1. Il est en effet bien établit que les manifestations cliniques de la NF1 au sein d'une même famille peuvent être très variables et sans corrélation génotype-phénotype évidente. Il est possible de supposer que la variabilité stochastique du *timing* de perte de fonction de *NF1* pendant l'embryogenèse pourrait jouer un rôle sur cette variabilité phénotypique. Une inactivation somatique de *NF1* précocement dans les précurseurs de cellules de Schwann pourrait conduire à un phénotype plus sévère parce qu'elle pourrait toucher un pool plus important de dérivés gliaux (Parrinello *et al.* 2009).

Le développement de neurofibrome est très rapide et extensif dans les modèles murins *Dhh*-Cre;*Nf1*$^{flox/flox}$ et *Krox20*-Cre;*Nf1*$^{flox/-}$ alors qu'elles se développent plus tardivement dans les souris *P0*-Cre;*Nf1*$^{flox/-}$. Les gènes *Dhh* et *Krox20* s'expriment respectivement à E12,5 et E10,5 dans les cellules de capsules frontières (Figure 14). La localisation de ces tumeurs et la rapidité de la tumorigenèse suggèrent une origine des cellules des capsules frontières plutôt qu'une origine de précurseurs de cellules de Schwann pour ces tumeurs mais ceci reste à prouver.

Dans les travaux précédents, le gène *Nf1* est inactivé de façon continue depuis le stade le plus précurseur de la cellule de Schwann jusqu'au stade de Schwann mature. En 2011, deux équipes rapportent l'étude de souris dans lesquelles la Cre-recombinase est inductible par l'administration de tamoxifène : *Plp*-Cre-ERT;*Nf1*$^{flox/-}$ et *Plp*-Cre-ERT;*Nf1*$^{flox/flox}$ (Le *et al.* 2011 ; Mayes *et al.* 2011), permettant un contrôle temporel de l'inactivation de *Nf1*.
Lu *et al.* rapportent la survenue de neurofibromes plexiformes non seulement chez les souris *Plp*-Cre-ERT;*Nf1*$^{flox/-}$, dans lesquelles la perte de *Nf1* est induite au stade embryonnaire (E12,5), mais aussi chez les souris dans lesquelles la perte de *Nf1* est induite en période périnatale (P0-P5), lorsque la plupart des cellules de Schwann sont au stade immature. Etonnamment, l'inactivation de *Nf1* à l'âge adulte (entre 2 et 4 mois) conduit au développement de neurofibromes plexiformes mais au bout d'une longue période de vie (plus d'un an et demi) et dans un nombre limité de cas (2% des cas). L'inactivation de *Nf1* en période embryonnaire, lorsque les précurseurs de cellules de Schwann et les cellules de Schwann immatures sont les plus abondants, est donc associée à une susceptibilité accrue à développer des neurofibromes plexiformes.

En parallèle, Mayes *et al.* décrivent la formation de neurofibromes plexiformes non seulement chez les souris *Plp*-Cre-ERT;*Nf1*$^{flox/flox}$ dans lesquelles la perte de *Nf1* est induite en période périnatale (P1-P3) mais aussi chez ces souris dans lesquelles la perte de *Nf1* est induite à l'âge adulte (entre 8 et 10 semaines). Leurs tumeurs diffèrent par leur taille, leur timing d'apparition et la prévalence des manifestations hématopoïétiques les accompagnant. Dans ce modèle, la perte de *Nf1* en période périnatale conduit à la formation de petites tumeurs, tardivement dans la vie alors que la perte à l'âge adulte induit le développement de larges tumeurs apparaissant quatre mois après l'événement d'inactivation de *Nf1*. L'utilisation d'un rapporteur GFP permet l'identification des cellules dans lesquelles a eu lieu l'événement de

recombinaison incluant les cellules satellites des ganglions périphériques, les cellules de Schwann myélinisantes S100β+ et les cellules des nerfs périphériques $p75^{NTR}$ +.
Dans ces deux études, le développement de neurofibromes après induction de la délétion de *Nf1* à l'âge adulte peut s'expliquer par différentes hypothèses : (i) les cellules de Schwann matures peuvent donner des neurofibromes, (ii) une rare population de précurseurs ou cellules immatures persistent dans le système nerveux périphérique adulte ou (iii) les neurofibromes se développant pendant la période embryonnaire ou périnatale ou à l'âge adulte ont des cellules d'origines différentes. Des travaux additionnels seront nécessaires pour poursuivre l'exploration.

II-1.3. Rôle du microenvironnement dans le développement tumoral

L'influence du microenvironnement $NF1^{+/-}$ sur le développement des neurofibromes a été beaucoup discutée. Un rôle majeur des mastocytes, en particulier, a été rapporté.

La présence d'infiltrats de mastocytes est une observation fréquente dans les neurofibromes murins et humains.

L'étude de Zhu *et al.* montre que les souris KO (*Knock-Out*) conditionnelles pour *Nf1*, *Krox20*-Cre;$Nf1^{flox/flox}$, ne développent pas de neurofibromes. Cependant, les souris *Krox20*-Cre;$Nf1^{flox/-}$, c'est-à-dire KO pour *Nf1* dans les cellules exprimant *Krox20* et haplo-insuffisant *Nf1* dans les autres cellules de l'organisme développent de multiples neurofibromes plexiformes présentant histologiquement d'abondants infiltrats de mastocytes (Zhu *et al.* 2002). Les différences de phénotype entre les souris *Krox20*-Cre;$Nf1^{flox/flox}$ et *Krox20*-Cre;$Nf1^{flox/-}$ ont conduit à proposer que l'haplo-insuffisance *Nf1* du microenvironnement tumoral était essentiel pour le développement de neurofibromes. Cette hypothèse fut, plus récemment, renforcée par l'observation que les souris *Krox20*-Cre;$Nf1^{flox/flox}$ greffées avec des cellules de moelles osseuses $Nf1^{+/-}$ développent de multiples neurofibromes infiltrés par les mastocytes donneurs. A l'inverse, les souris *Krox20*-Cre;$Nf1^{flox/-}$ transplantées avec une moelle osseuse sauvage ne développent plus de tumeurs (Yang *et al.* 2008).

Suite à la création de ces modèles, les mécanismes de contribution des mastocytes dans la formation tumorale ont été explorés. Il est bien établit que les mastocytes migrent, prolifèrent, survivent et sécrètent des cytokines en réponse au SCF (*Stem Cell Factor)* aussi appelé ligand c-kit. (Staser *et al.* 2010) Les cellules de Schwann sécrètent ce ligand à l'état physiologique

(Hirota *et al.* 1993 ; Ryan *et al.* 1994). Cependant, les cellules de Schwann *NF1*$^{-/-}$ sécrètent des concentrations anormalement importante de SCF/c-kit qui recrute les mastocytes *NF1*$^{+/-}$ (Yang *et al.* 2003) (Figure 16).
Dans le modèle murin *Krox20*-Cre;*Nf1*$^{flox/flox}$ l'inhibition génétique de SCF/c-kit ou l'inhibition pharmacologique de la signalisation SCF/c-kit (par exemple avec l'Imatinib mesylate = Glivec®) dans les cellules de moelle osseuse *Nf1*$^{+/-}$ diminuent l'initiation et la progression des neurofibromes (Yang *et al.* 2008).

Les mastocytes *NF1*$^{+/-}$ stimulés par SCF/c-kit sécrètent un certain nombre de molécules comme des métalloprotéinases, des cytokines et des facteurs de croissance (comme le VEGF, le PDGF, le bFGF et le TGF-β) (Figure 16). Le rôle exact de ces molécules sécrétées n'est pas clairement établi en dehors du rôle du TGF-β (Yang *et al.* 2006). Les fibroblastes migrent, prolifèrent et synthétisent le collagène en réponse au TGF-β (*Transforming Growth Factor-β*). Yang *et al.* montrent que les mastocytes NF1$^{+/-}$ sécrètent une quantité plus importante de TGF-β que les mastocytes sauvages *in vitro*, qui potentialisent les fonction des fibroblastes *NF1*$^{+/-}$ (Yang *et al.* 2006). Les fibroblastes *NF1*$^{+/-}$ traités avec le TGF-β ont donc une production accrue de collagène, qui est un des composants majoritaires des neurofibromes.

D'autres types cellulaires du microenvironnement semblent impliqués dans le développement tumoral comme les cellules vasculaires. Les cellules musculaires lisses des vaisseaux et les cellules endothéliales *NF1*$^{+/-}$ ont une migration et prolifération augmentées par rapport aux cellules WT (Li *et al.* 2006 ; Munchhof *et al*. 2006). Les cellules de Schwann semblent pouvoir produire une réponse angiogénique hyperactive en sécrétant le VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) et le bFGF (*basic Fibroblast Growth Factor*) (Munchhof *et al*. 2006).

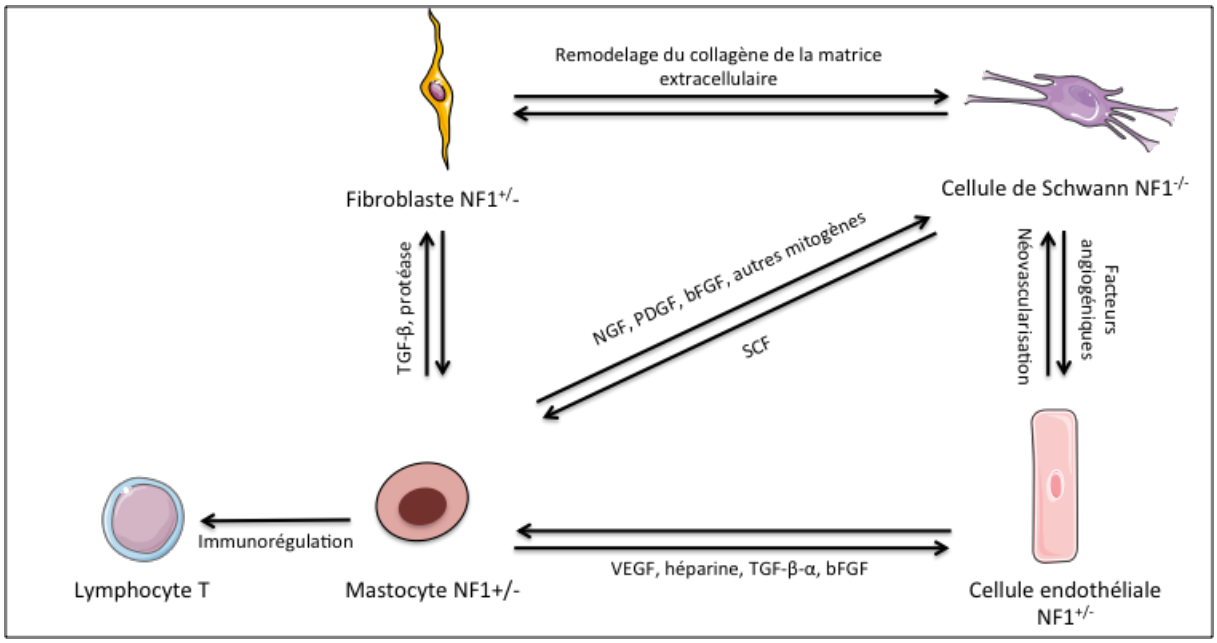


Figure 16. Les possibles interactions entre les cellules de Schwann inactivées *NF1* et les autre types cellulaires hétérozygotes *NF1* au sein du microenvironnement tumoral.
Les mastocytes peuvent être recrutés par les cellules de Schwann par des molécules chimiotactiques comme le SCF. Une fois recrutée, ces cellules peuvent secréter des facteurs mitogènes pour initier la tumorigenèse, des facteurs angiogéniques pour promouvoir la néo-vascularisation ou des facteurs types TGF-β qui stimule la production de collagène et remodèle la matrice extracellulaire. Extrait de Le *et al.* 2007.

L'ensemble de ces données suggère donc que le microenvironnement $NF1^{+/-}$ constitue une niche critique dans l'induction paracrine de la formation d'un neurofibrome (Figure 16). Il est toutefois important de rappeler que l'inactivation bi-allélique de *Nf1* dans la souris *Dhh*-Cre;$Nf1^{flox/flox}$ permettait la formation de neurofibromes plexiformes malgré un microenvironnement *Nf1* sauvage (Wu *et al.* 2008).

II-2. Les MPNST

II-2.1. Caractéristiques anatomo-pathologiques et immunohistochimiques d'une MPNST

Les MPNST sont des tumeurs rares représentant 5% des sarcomes des tissus mous. Plus de 50% de ces tumeurs surviennent dans un contexte NF1, environ 10% sont induites par des radiations et les 40% restants surviennent chez des patients sans prédisposition connue. Chez les patients NF1, la grande majorité des MPNST survient à partir de neurofibromes plexiformes. Des très rares cas de MPNST se développant à partir de Schwannomes, de ganglioneuroblastomes ou phéochromocytomes ont été rapportés. Les caractéristiques anatomo-pathologiques et immunohistochimiques des MPNST ne sont pas très spécifiques

d'où la difficulté, dans certains cas, de poser le diagnostic. Les MPNST sont des tumeurs anaplasiques, à haut index mitotique, hyper-cellulaires, notamment au niveau des régions péri-vasculaires, et présentant souvent des plages de nécroses (Figure 17). Une étude récente rapporte que les MPNST montrent un marquage positif diffus pour Ki67, témoin de la prolifération cellulaire. En revanche, ces tumeurs perdent le marquage pour la neurofibromine. Elles montrent le plus souvent une perte d'expression de *p16*, une expression diffuse d'*EGFR* et une perte d'expression des marqueurs de cellules de Schwann *S100β* et *SOX10* (Figure 17) (Pekmezci *et al.* 2015).

Le diagnostic différentiel des MPNST est souvent délicat à cause du manque de sensibilité et de spécificité des marqueurs diagnostics utilisés à l'heure actuelle. Il inclut une grande variété de sarcomes : des fibrosarcomes, des sarcomes synoviaux, des rhabdomyosarcomes, des leiomyosarcomes, des liposarcomes et des sarcomes à cellules claires. La perte partielle ou complète d'expression de *S100β* est un des marqueurs les plus utiles pour distinguer les MPNST des tumeurs bénignes de cellules de Schwann. Cependant, la perte d'expression de ce marqueur est insuffisante pour poser le diagnostic de MPNST (Rodrigez *et al.* 2013).

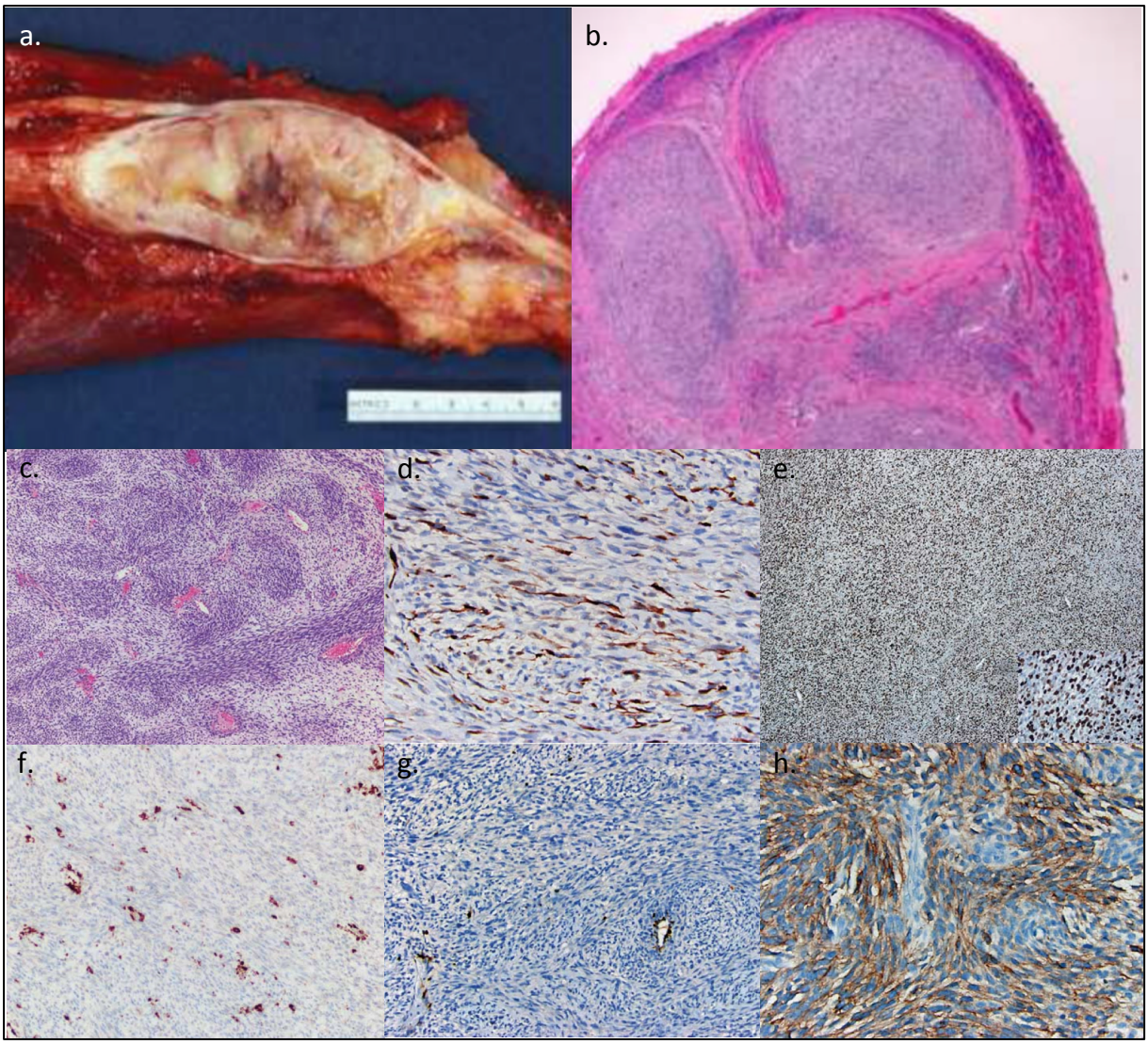


Figure 17. Caractéristiques anatomo-pathologiques et immunohistochimiques des MPNST.
a. Les MPNST créent des masses charnues et bigarrées impliquant de larges troncs nerveux périphériques. b. L'implication de plusieurs fascicules est habituellement appréciée sur des coupes transversales. c. Les MPNST montrent une hyper-cellularité essentiellement péri-vasculaire. d. Le marquage S100β est souvent négatif à l'exception de quelques cellules de Schwann probablement enchassées dans la tumeur. e. Le marquage Ki67 est positif et diffus. f. La neurofibromine n'est plus exprimé dans les cellules de MPNST à l'exception des cellules vasculaires et inflammatoires. g. L'expression de *p16* est perdue dans les MPNST mais reste présente dans les vaisseaux. h. EGFR montre un marquage diffus dans les MPNST. Extrait de Rodrigez *et al.* 2013 ; Pekmezci *et al.* 2015.

II-2.2. Grades et facteurs pronostiques des MPNST

Les MPNST peuvent être classés en différents grades. Cette classification n'est pas homogène dans le monde. La classification OMS (Organisation Mondiale de la Santé) de 2013 distingue :

- le MPNST de bas grade
- le MPNST de haut grade
- le MPNST épithélioide
- le MPNST à la différenciation divergente

- le MPNST ex-Schwannome
- le Schwannome mélanotique malin
- le MPNST périneurial

Les anatomo-pathologistes français proposent une classification en trois grades basée sur la différenciation tumorale, l'index mitotique et la nécrose tumorale (Coindre 2006).

La majorité des MPNST (85%) sont des tumeurs de haut-grade au pronostic très défavorable. Les MPNST de bas-grade sont parfois appelés « neurofibromes atypiques ». Ce sont des tumeurs classiquement alarmantes sur le plan histologique mais qui ne remplissent pas tous les critères de malignité. Il est possible que ces tumeurs soient un stade intermédiaire entre le neurofibrome plexiforme et le MPNST de haut-grade. La localisation au niveau des troncs nerveux, la taille de la tumeur > 5 cm, la récurrence locale et la classification « haut-grade » sont les facteurs de mauvais pronostic selon l'OMS.

II-2.3. Anomalies génomiques impliquées dans la progression des neurofibromes plexiformes en MPNST.

La transformation maligne d'un neurofibrome plexiforme en MPNST requière l'accumulation de mutations additionnelles. La nature et la séquence exacte de ces événements moléculaires biologiques ne sont pas exactement connues.

II-2.3.a) Altération des voies $p16^{INK4A}$-$p15^{INK4B}$-CDK4/6-RB et $p14^{ARF}$-MDM2-p53

Les premières altérations récurrentes identifiées dans les MPNST affectent les voies de régulation du cycle cellulaire $p16^{INK4A}$-$p15^{INK4B}$-CDK4/6 (*Cyclin Dependant Kinase*)-RB (*RetinoBlastoma*) et $p14^{ARF}$-MDM2-p53 (Figure 18).

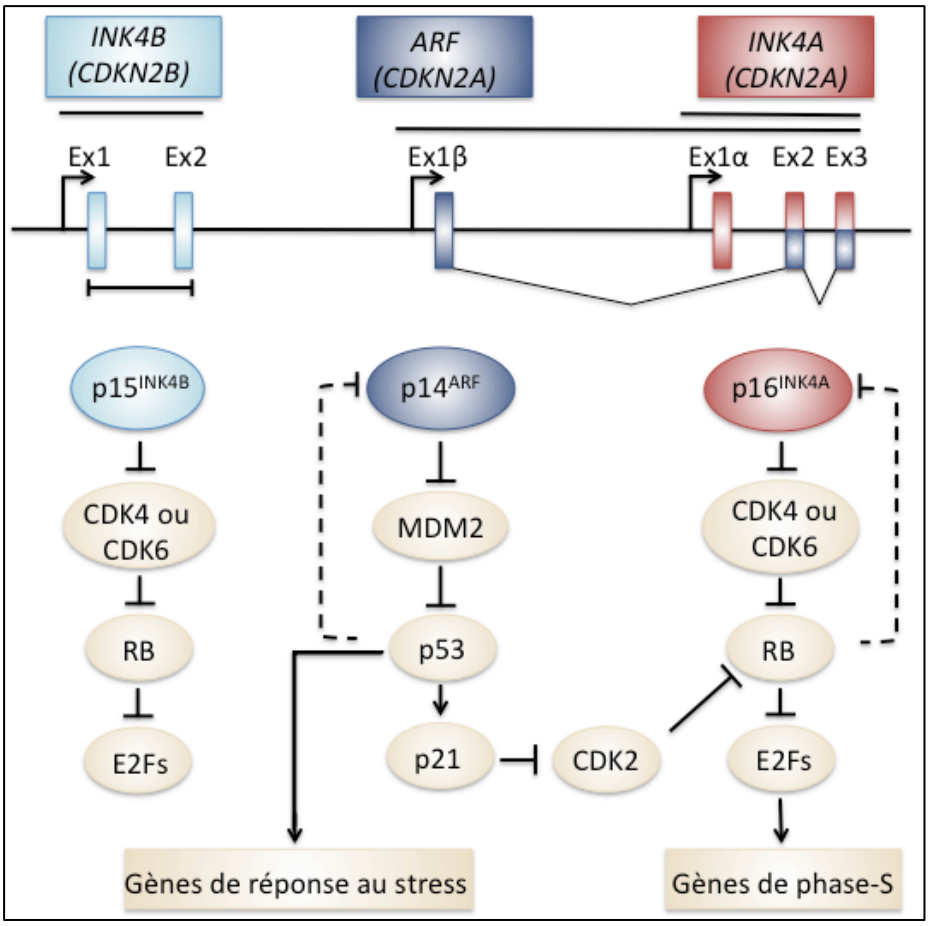


Figure 18. Locus *CDKN2A-CDKN2B*.
Le locus *CDKN2A-CDKN2B*, d'une taille inférieure à 50kb, code trois protéines suppresseur de tumeurs : $p15^{INK4B}$, $p14^{ARF}$ et $p16^{INK4A}$. Les exons du locus sont indiqués par des barres verticales de couleurs et les trois promoteurs sont indiqués par des flèches. Le gène *CDKN2B* possède deux exons et code $p15^{INK4B}$ (en bleu clair). Le gène *CDKN2A* code $p14^{ARF}$ ($p19^{ARF}$ chez la souris, trois exons en bleu foncé) et $p16^{INK4A}$ (trois exons en rouge). Les protéines $p16^{INK4A}$ et $p15^{INK4B}$ inhibent CDK4 et CDK6 (*Cyclin Dependant Kinase*) empêchant ainsi la phosphorylation de la protéine RB (*Retinoblastoma Protein*). La forme hypophosphorylée de RB séquestre le facteur de transcription E2F et évite ainsi l'activation de gènes requis pour la réplication de l'ADN. La protéine $p14^{ARF}$ se lie à l'ubiquitine ligase MDM2 E3, empêche la polyubiquitinylation de p53 et donc sa dégradation par le protéosome. Le facteur de transcription p53 régule un groupe de gènes dont l'expression est induite par un stress cellulaire. Parmi ces gènes se trouvent le gène codant $p21^{CIP1}$ qui inhibe la phosphorylation de RB médiée par CDK2 au cours du cycle cellulaire. L'inactivation de p53 conduit à l'activation $p14^{ARF}$ alors que l'inactivation de RB induit l'expression de $p16^{INK4A}$. Cette boucle de rétrocontrôle négatif est représentée par la ligne en pointillée. La délétion du locus *CDKN2A-CDKN2B* dans les MPNST supprime la fonction suppresseur de tumeurs de RB et p53 et facilite l'auto-renouvellement cellulaire. Extrait de Sharpless et Sherr 2015.

Des délétions et mutations perte de fonction du gène *TP53* (*Tumor Protein p53*) ont été décrites dans un grand nombre de MPNST. Le gène *TP53* est un gène suppresseur de tumeur majeur en cancérologie puisqu'il est muté dans prêt de 50% des tumeurs tout type confondu. Une étude de la littérature par l'équipe de Verdijk rapporte la présence de mutation hétérozygote de *TP53* dans 14% des MPNST, la perte d'hétérozygotie de *TP53* dans 39% des MPNST et un marquage par immunohistochimie des tumeurs (témoin de la mutation du gène *TP53*) dans 53% (Verdijk *et al.* 2010). Cette inactivation de p53 est très spécifique du stade MPNST puisqu'elle n'est pas retrouvée au stade neurofibrome.

Des délétions emportant le locus *CDKN2A* (*Cyclin-Dependent Kinase inhibitor 2A)/CDKN2B* sur le chromosome 9 en 9p21 sont décrites dans 50% des MPNST ((Kourea et *al.* 1999 ; Nielsen *et al.* 1999 ; Perrone *et al.* 2003). Elle sont souvent retrouvées à l'état homozygote et sont associées à un mauvais pronostic (Endo *et al.* 2011). Elles sont particulièrement délétères puisqu'elles dérégulent à la fois la voie $p16^{INK4A}$-$p15^{INK4B}$-CDK4/6-RB et la voie $p14^{ARF}$-MDM2-p53. De plus, il a été montré que cette délétion était un événement précoce dans la progression tumorale puisqu'elle pouvait être retrouvée dans les neurofibromes atypiques pré-cancéreux (Beert *et al.* 2011).

Enfin, une dernière façon d'inactiver les voies $p16^{INK4A}$-$p15^{INK4B}$-CDK4/6-RB et $p14^{ARF}$-MDM2-p53 dans les MPNST est l'inactivation de la protéine RB qui est décrite de façon plus anecdotique dans quelques tumeurs (Mawrin *et al.* 2002 ; Mantripragada *et al.* 2008).

II-2.3.b) Altération de la voie PI3K-AKT-mTOR

Des altérations de la voie PI3K-AKT-mTOR ont aussi été mises en évidence. Les plus fréquentes sont des altérations de *PTEN* (*Phosphate and TENsin homologue tumor suppressor*), un gène suppresseur de tumeurs, inhibiteur de la voie PI3K-AKT-mTOR. Ainsi, des monosomie et des diminutions d'expression de *PTEN* sont identifiées dans des MPNST (Mawrin *et al.* 2002 ; Perrone *et al.* 2009).

II-2.3.c) Signalisation aberrante

Des études ont exploré la possibilité d'un rôle critique de la signalisation aberrante de facteurs de croissance pour l'activation des protéines RAS dans les MPNST. Ces études ont identifié plusieurs facteurs de croissance ou récepteurs aux facteurs de croissance comme potentiel acteur de la tumorigenèse des MPNST. Ainsi, des amplifications focales génomiques d'*EGFR* (*Epidermal Growth Factor Receptor*), *ERBB2* (*Erb-b2 receptor tyrosine kinase 2*), *KIT* (*KIT proto-oncogene receptor tyrosine kinase*), *MET* (*MET proto-oncogene, receptor tyrosine kinase*) et *PDGFRA* (*Platelet-Derived Growth Factor Receptor-Alpha*) ont été décrites dans les MPNST (Caroll *et al.* 2012). Cependant, leur rôle exact dans la progression tumorale reste encore à prouver.

II-2.3.d) Remaniements chromosomiques majeurs

Comme la plupart des sarcomes, les MPNST ont un caryotype complexe avec de multiples gains et pertes de grandes régions chromosomiques voire de bras entiers de chromosomes, des réarrangements chromosomiques complexes et une ploïdie souvent anormale.

L'analyse moléculaire de MPNST menée par l'équipe de Castellasagué *et al.* décrit en moyenne des altérations de 75,7% du génome (Castellasagué *et al.* 2015). Cette équipe évoque la possibilité de l'origine d'un événement catastrophique unique conduisant à ces remaniements multiples dans les MPNST. Il pourrait donc s'agir d'un phénomène de chromothripsis (du grec « *chromo »* pour chromosome, et « *thripsis »* pour briser en éclat), phénomène décrit dans différents cancers. Ce phénomène se caractérise, en effet, par la pulvérisation d'un ou de plusieurs segment(s) chromosomique(s) et le réassemblage aléatoire des fragments chromosomiques générés se produisant au cours d'un seul événement cellulaire (Storchova *et al.* 2016 ou Forment *et al.* 2012 pour revue).

La complexité des remaniements observés rend difficile l'identification d'évènements récurrents. Néanmoins, des délétions récurrentes du locus *NF1* sur le chromosome 17q et du locus *CDKN2A/CDKN2B* sur le chromosome 9p21 sont retrouvées. Des pertes récurrentes des portions des chromosomes 1p, 11, 12p, 14q, 18, 22q, X et Y sont également décrites ainsi que des gains focaux sur les chromosomes 7, 8q et 15q (Caroll *et al.* 2012).

II-2.4. Modèles in vivo pour l'étude de la pathogenèse de neurofibromes et MPNST.

Les neurofibromes plexiformes, se développant chez les souris génétiquement modifiées que nous avons décrit précédemment, ne se transforment qu'exceptionnellement en MPNST. Ces modèles sont donc d'une utilité limitée pour comprendre le processus de transformation maligne. La mutation concomitante de *Nf1* et d'un autre suppresseur de tumeurs, fréquemment retrouvé muté dans les MPNST, a été réalisée pour modéliser les tumeurs malignes NF1.

II-2.4.a) MODELES MURINS

⇒ Altération des voies $p16^{INK4A}$-$p15^{INK4B}$-Cdk4/6-Rb et $p14^{ARF}$-Mdm2-p53

Des souris porteuses de mutations germinales inactivatrices de *Nf1* et *Trp53* sur le même chromosome 11 (*cis* $Nf1^{+/-}$;$Trp53^{+/-}$) ou sur des chromosomes différents (*trans* $Nf1^{+/-}$;$Trp53^{+/-}$) ont été générées (Cichowski *et al.* 1999 ; Vogel *et al.* 1999). Chez la souris, le mécanisme le

plus fréquent du second hit de mutation est la perte du chromosome entier. Les souris mutées en *cis* $Nf1^{+/-}$;$Trp53^{+/-}$ développent, dans 30% des cas, des MPNST à l'âge de 5 mois. Comme attendu, les tumeurs présentent une inactivation complète de *Nf1* et *Trp53* par perte du chromosome entier.

D'autre part, des souris triples mutantes $Nf1^{+/-}$; $p16^{Ink4a-/-}$; p$19Arf^{+/-}$ ont été générés et développent des MPNST dans 26% des cas, contrairement aux souris doubles mutantes $Nf1^{+/-}$;$p16^{Ink4a-/-}$ ou $Nf1^{+/-}$;$p19^{Arf+/-}$ (Joseph *et al.* 2008 ; King *et al.* 2002).

Ces modèles confirment que le gènes *Nf1*, *Trp53* et *Cdkn2a/Cdkn2b* peuvent jouer un rôle majeur dans la tumorigenèse des MPNST.

⇒ Altération de la voie Pi3k-Akt-mTor et signalisation aberrante

L'haplo-insuffisance ou la perte complète de *Pten* dans les cellules de Schwann murines accélère la formation de neurofibromes et suffit au développement de MPNST de haut grade dans un contexte $Nf1^{-/-}$ (Keng *et al.* 2012). De plus, la combinaison de l'activation de *K-Ras* et de la délétion d'un allèle de *Pten* conduit à 100% de souris développant des MPNST montrant la coopération de l'hyperactivation de la voie RAS/MAPK avec la dérégulation de la voie PI3K/AKT/mTOR dans le processus de transformation maligne (Gregorian *et al.* 2009). Cette coopération a été confirmée par l'étude de Keng *et al.* décrivant le développement de MPNST chez des souris dans lesquelles *Pten* a été inactivé et *Egfr* surexprimé dans les cellules de Schwann (Keng *et al.* 2012).

Cependant, dans tous ces modèles, les MPNST surviennent majoritairement *de novo* et ne se développent pas à partir d'un neurofibrome plexiforme. Ils ne récapitulent pas fidèlement la progression tumorale.

⇒ Identification de gènes drivers de la tumorigenèse par des études sans *à priori*

Très récemment, afin d'identifier des gènes drivers de la tumorigenèse des MPNST, des expériences utilisant la méthode « *Sleeping Beauty* », un système de mutagenèse induite par insertion de transposons, ont été conduites dans les cellules de Schwann et leurs précurseurs grâce au transgène *Cnp*-Cre (Rahrmann *et al.* 2013). Des souris porteuses d'un allèle conditionnel dominant-négatif $Trp53^{R270H}$ et/ou d'un transgène *Cnp*-EGFR ont été testées.

Les sites récurrents d'insertion des transposons ont été analysés dans les tumeurs qui se développaient chez ces souris. La position et l'orientation du transposon inséré est analysé par rapport à la direction transcriptionnelle du gène pour prédire s'il induit ou interrompt la transcription du gène. Quatre-vingt sept sites d'insertions récurrents de transposons ont été retrouvés dans les MPNST. L'analyse des gènes associés à ces sites a permis de retrouver l'importance de la voie PI3K-AKT-mTOR et des voies de signalisation des récepteurs aux facteurs de croissance et a permis l'identification du rôle de la voie de signalisation Wnt/β-caténine dans la tumorigenèse des MPNST (Watson *et al.* 2013 cf plus loin).

D'autres études de comparaisons transcriptomiques de neurofibromes et MPNST murins et humains ont montrées en commun l'activation la voie Raf/MEK/ERK associée au développement tumorale (Jessen *et al.* 2013). Ces résultats ont alors conduit à tester l'utilisation d'un inhibiteur de MEK pour freiner le développement tumoral. Le succès de cet essai a abouti à l'utilisation d'inhibiteurs de MEK dans des essais cliniques.

II-2.4.b) Modélisation de la NF1 chez le POISSON-ZEBRE

Le gène *NF1* a deux orthologues chez le poisson-zèbre : les gènes *nf1a* et *nf1b*. Ces gènes partagent une grande homologie de séquence avec le gène humain. En effet, ces orthologues partagent 84% d'identité de séquences en acides aminés dont 93% d'identité pour le domaine GRD. Ils conservent une relation synthénique avec le gène humain sur le chromosome 17q11.2 (Amores *et al.* 1998). L'utilisation de morpholino responsables de l'inactivation combiné de *nf1a* et *nf1b* a conduit à des anomalies de développement cardiovasculaire et du système nerveux du poisson (Padmanabhan *et al.* 2009). L'établissement de mutants stables a montré que les larves porteuses de seulement un des deux allèles *nf1a* ou *nf1b* sauvages étaient fertiles et viables et ne présentaient pas de phénotype particulier au cours du développement. En revanche, les larves $nf1a^{-/-}$; $nf1b^{-/-}$ ont des anomalies de pigmentation dès 6 jours post-fertilisation (jpf) et ne survivent pas au delà de 10 jpf. A partir de 4 jpf, les larves $nf1a^{-/-}$; $nf1b^{-/-}$ présentent une hyperplasie des cellules progénitrices des oligodendrocytes et des cellules de Schwann et une hypoplasie des mélanophores.

Dans un environnement p53 muté, ($p53^{e7/e7}$), $nf1a^{+/-}$; $nf1^{+/-}$, les poissons développent des gliomes de haut grade et des MPNST, prouvant le rôle suppresseur de tumeurs de ces gènes chez le poisson-zèbre (Shin *et al.* 2012).

Chez le poisson-zèbre, des tumeurs ressemblant très fortement aux MPNST humains ont été décrites dans plusieurs mutants. Des mutations inactivatrices dans 17 des 28 gènes codant les protéines ribosomiales (pr), dans le gène *tp53*, dans trois gènes majeurs de réparation de *mismatch* (MMR pour *MisMatch Repair*) et dans le gène *nf2a* prédisposent au développement de MPNST (Amsterdam *et al.* 2004 ; Berghmans *et al.* 2005 ; Feitsma *et al.* 2008 ; Lai *et al.* 2009). Dans les MPNST dérivés de poissons porteurs de mutations dans un gène de pr, l'absence de synthèse de p53 a été rapportée bien que ce gène soit à l'état sauvage. Les MPNST survenant chez les poissons hétérozygotes pour pr ou homozygote pour la mutation tp53 sont souvent aneuploides. Cette caractéristique est commune aux MPNST humains mais n'est pas retrouvé dans les tumeurs murines. Pour ces raisons, le poisson-zèbre est un modèle intéressant pour l'étude des bases moléculaires des MPNST.

II-2.5. Prise en charge des MPNST

Il n'y a pas de recommandation spécifique pour le traitement des MPNST par rapport aux autres sarcomes des tissus mous. Les recommandations de l'ESMO (*European Society for Medical Oncology*) préconise, comme premier traitement, la chirurgie avec l'obtention de marges saines. Malgré les tentatives de plusieurs modèles de traitements, le pronostic des MPNST reste très mauvais avec une survie à cinq ans de 23 à 69% (Valentin *et al.* 2016). Une étude récente rapporte les données de prise en charge et de survie de la plus grande cohorte jamais publiée de patients présentant une MPNST (Valentin *et al.* 2016). Elle était constituée de 353 patients provenant de 11 centres français. 61% de ces patients avaient une MPNST sporadique et 39% une MPNST NF1. Chez 83% de ces patients, l'exérèse chirurgicale de la tumeur a été tentée. Après la chirurgie, 59% des patients opérés ont reçu un traitement adjuvant : 91% de la radiothérapie et 36% de la chimiothérapie à base de doxorubicine. La survie à cinq ans de ces patients était de 59%. Les patients présentant des tumeurs non-résecables ont reçu dans 72% des cas une chimiothérapie palliative de doxorubicine seule (37%) ou doxorubicine et ifosfomide (63%). La médiane de survie globale de ces patients était de 13 mois. De façon générale la médiane de survie était plus courte chez les patients présentant une MPNST NF1 par rapport à une MPNST sporadique sans qu'aucune explication rationnelle ne puisse être proposée pour l'expliquer.

Plusieurs essais cliniques sont actuellement en cours pour améliorer la survie des patients (Tableau IV). Quarante-cinq études sont actuellement répertoriées sur le site

https://clinicaltrials.gov/. La plupart des traitements en essai clinique proposent l'utilisation d'inhibiteurs de tyrosines kinase et de leurs récepteurs (RTK) ou d'inhibiteurs de mTOR.

Tableau IV. Liste des essais cliniques ayant lieu chez des patients présentant des MPNST répertoriés sur clinicaltrials.gov

	Identifiant	Molécules	Fonctions	Phase de l'essai	Statut	Conditions
1	NCT02691026	Pembrolizumab	Ac monoclonal anti PD-1 (*Programmed Death-1*) qui potentialise les réponses anti-tumorales des lymphocytes T	Phase 2	Pas encore ouvert à recrutement	MPNST métastatique ou localement avancé ou non résecable
2	NCT01661283	Everolimus et Bevacizumab	Ibteur mTOR et Ac monoclonal anti-VEGF	Phase 2	En cours	MPNST réfractaire à la chimiothérapie
3	NCT02008877	Ganetespib et Sirolimus	Ibteur HSP90 et Ibteur mTOR	Phase 2	En cours, pas de recrutement	MPNST métastatique ou non résecable
4	NCT00427583	Imatinib mesylate	Ibteur RTK	Phase 2 Phase 3	Terminé	MPNST
5	NCT02452554	Lorvotuzumab mertansine	Ac-CD56 attaché à un agent cytotoxique (DM1) agissant sur le microtubule	Phase 2	Recrute des participants	Patients jeunes non répondeur ou en rechute présentant une tumeur de Wilms ou rhabdomyosarcoma, neuroblastoma, pleuropulmonary blastoma, MPNST, or synovial sarcoma
6	NCT02584647	PLX3397 et Sirolimus	Ibteur RTK et Ibteur mTOR	Phase 2	Recrute des participants	MPNST
7	NCT00304083	Doxorubicin, Ifosfamide et Etoposide	Agent intercalant, Agent alkylant et Ibteur de topoisomérase	Phase 2	Terminé	MPNST de stade III ou IV
8	NCT02700230	Thérapie vaccinale		Phase 1	Pas encore ouvert à recrutement	MPNST non résecable ou récurrent
9	NCT02584647	PLX3397 et Sirolimus	Ibteur RTK et Ibteur mTOR	Phase 2	Recrute des participants	MPNST
10	NCT02684058	Dabrafenib	Ibteur RTK	Phase 2	Pas encore ouvert à recrutement	Enfants et adolescents présentant une tumeur de haut grade (dont MPNST) avec une mutation BRAF V600 en rechute ou réfractaire
11	NCT00004853	Filgrastim	Forme recombinante du G-CSF (*Granulocyte Colony-Stimulating Factor*)	Phase 1	Terminé	Sarcome nouvellement diagnostiqué
12	NCT00068367	Erlotinib	Ibteur RTK (EGFR)	Phase 2	Terminé	MPNST métastatique ou non résecable
13	NCT00464620	Dasatinib	Ibteur RTK	Phase 2	En cours, pas de recrutement	Sarcome avancé
14	NCT00837148	Sorafenib et Dacarbazine	Ibteur multikinases et Analogue structural de l'amino-5 imidazole-4 carboxamide	Phase 2	Terminé	Sarcome
15	NCT00346164	Doxorubicin hydrochloride	Agent intercalant	Phase 3	En cours, pas de recrutement	Patients de mois de 30 ans présentant un sarcome des tissus mous
16	NCT02180867	Radiation seule ou avec Ifosfamide et Doxorubicin hydrochloride ou Pazopanib hydrochloride	Agent alkylant, Agent intercalant et Ibteur RTK	Phase 2 Phase 3	Recrute des participants	Sarcome des tissus mous non-rhabdomyosarcoma nouvellement diagnostiqué et résecable
17	NCT00720174	Cixutumumab et Doxorubicin hydrochloride	Ac anti-IGF-1R (*Insulin-like Growth Factor-1 Receptor*) et Agent intercalant	Phase 1	En cours, pas de recrutement	Sarcome des tissus mous métastatique ou localement avancé ou non résecable
18	NCT02601209	Sapanisertib comparé au Pazopanib hydrochloride	Ibteur mTOR et Ibteur RTK	Phase 1 Phase 2	Recrute des participants	Sarcome métastatique ou localement avancé ou non résecable
19	NCT00245102	Sorafenib tosylate	Ibteur multikinases	Phase 2	Terminé	Sarcome métastatique ou localement avancé ou non résecable
20	NCT00112463	Romidepsin	Ibteur HDAC (*Histone DeACetylase*)	Phase 2	En cours, pas de recrutement	Sarcome des tissus mous métastatique ou non résecable
21	NCT01614795	Cixutumumab et	Ac anti-IGF-1R et Ibteur mTOR	Phase 2	En cours, pas de recrutement	Sarcome récurrent ou réfractaire

		Temsirolimus				
22	NCT02584309	Dexrazoxane et Doxorubicin	Agent cardioprotecteur et Agent intercalant	Phase 2	Recrute des participants	Sarcome métastatique ou localement avancé
23	NCT01418001	Gemcitabine, Docetaxel et Pazopanib	Antimétabolite pyrimidique, Stabilisateur microtubule, Ibteur RTK	Phase 1 Phase 2	Terminé	Sarcome
24	NCT00931931	HSV1716	Thérapie virale oncolytique	Phase 1	Recrute des participants	Tumers solides exceptées celles du SNC
25	NCT01532687	Gemcitabine hydrochloride avec et sans Pazopanib hydrochlorid	Antimétabolite pyrimidique et Ibteur RTK	Phase 2	Recrute des participants	Sarcome des tissus mous réfractaire
26	NCT01154452	RO4929097 et Vismodegib	Ibteur Notch et Ibteur Hedghog	Phase 1 Phase 2	Terminé	Sarcome avancé ou métastatique
27	NCT01653028	Alisertib	Ibteur séléctif de la kinase Aurora A	Phase 2	Recrutement suspendu	Sarcome avancé ou métastatique
28	NCT01169584	JX-594 (Pexa-Vec)	Thérapie virale oncolytique	Phase 1	Terminé	Patients pédiatriques présentant une tumeur solide avancée/métastatique non-résecable réfractaire ou intolérant à thérapie standard
29	NCT00154388	Imatinib mesylate	Ibteur RTK	Phase 2	Terminé	laladie rare maligne
30	NCT00450736	Celecoxib et radiation	Ibteur COX2 (Cyclo-OXygénase-2)	Phase 1	Terminé	Sarcome des tissus mous des extrémités
31	NCT01883518	Vaccin par cellules dendritiques autologues		Phase 1 Phase 2	Recrute des participants	Sarcome des tissus mous
32	NCT01189253	Trabectedin comparé à Doxorubicin hydrochloride	Blocage de liaison du facteur de transcription oncogénique (FUS-CHOP) à l'ADN	Phase 2 Phase 3	Terminé	Sarcome des tissus mous avancé ou métastatique
33	NCT00526149	BI 2536	Ibteur sélectif de Plk1 (*Polo-Like Kinase 1*)	Phase 2	Terminé	Tumeur solide récurrente ou métastatique
34	NCT00474994	Sunitinib	Ibteur RTK	Phase 2	Terminé	Sarcome métastatique ou localement avancé ou récurrent
35	NCT00061984	Doxorubicin et Ifosfamide et Pegfilgrastim	Agent alkylant, Agent intercalant et Forme recombinante du G-CSF	Phase 3	Terminé	Sarcome des tissus mous avancé ou métastatique
36	NCT00053794	Perifosine	Ibteur AKT et PI3K	Phase 2	Terminé	Sarcome des tissus mous avancé ou métastatique
37	NCT00041249	Brostallicin	Agent alkylant	Phase 2	Terminé	Sarcome des tissus mous avancé ou métastatique ne répondant pas à une 1ère chimiothérapie
38	NCT00041236	Exatecan mesylate	Ibteur de topoisomérase	Phase 2	Terminé	Sarcome des tissus mous avancé
39	NCT00030784	Liposomal doxorubicin et Ifosfamide	Agent alkylant et Agent intercalant	Phase 1	Terminé	Sarcome des tissus mous avancé ou métastatique
40	NCT00006357	Imatinib mesylate	Ibteur RTK	Phase 1 Phase 2	Terminé	Sarcome des tissus mous récurrent ou réfractaire
41	NCT00003939	Trabectedin	Blocage de liaison du facteur de transcription oncogénique (FUS-CHOP) à l'ADN	Phase 2	Terminé	Sarcome des tissus mous avancé
42	NCT00003212	Ifosfamide et Doxorubicin	Agent intercalant et Agent alkylant	Phase 3	Terminé	Sarcome des tissus mous avancé ou métastatique
43	NCT00031915	Imatinib mesylate	Ibteur RTK	Phase 2	Terminé	Sarcome osseux ou des tissus mous métastatique ou localement avancé ou non-résecable
44	NCT00949325	Temsirolimus et Liposomal doxorubicin	Ibteur mTOR et Agent alkylant	Phase 1 Phase 2	Terminé	Sarcome récurrent
45	NCT02301039	Pembrolizumab	Ac monoclonal anti PD-1 (*Programmed Death-1*) qui potentialise les réponses anti-tumorales des lymphocytes T	Phase 2	En cours, pas de recrutement	Sarcome avancé

III- CHAPITRE 3. Importance de la voie de signalisation WNT au cours des processus de tumorigenèse

Plusieurs arguments nous ont conduit à explorer l'implication de la voie WNT dans la transformation maligne du neurofibrome plexiforme en MPNST.

III-1. Signalisation de la voie WNT

La signalisation WNT comprend trois voies majeures: la voie canonique WNT/β-caténine, la voie WNT/calcium, et la voie PCP (*Planar-Cell Polarity*) de polarité planaire cellulaire (Figure 19).

La voie canonique WNT/β-caténine est la voie la plus étudiée et son inhibition a fait l'objet de recherches intensives notamment en cancérologie. Elle fait intervenir *in fine* le complexe de transactivation β-caténine/TCF (*T-Cell-specific transcription Factor*)/LEF (*Lymphoid Enhancer-binding Factor*) contrôlant l'expression de nombreux gènes. En l'absence de ligand WNT, la protéine β-caténine cytoplasmique est constamment dégradée par le complexe AXIN qui se compose de l'AXIN, du suppresseur de tumeurs APC (*Adenomatous Polyposis Coli*), de CK1 (*Casein Kinase 1*) et de GSK3β (*Glycogen Synthase Kinase 3* β). Ce complexe phosphoryle la β-caténine entrainant son ubiquitinylation et sa dégradation par le protéasome. L'élimination continue de la β-caténine empêche son accumulation dans le cytoplasme et sa localisation nucléaire. Les gènes cibles de WNT sont alors réprimés par les protéines TCF/LEF. La voie WNT/β-caténine est activée lorsqu'un ligand WNT se lie à un récepteur FZD (*Frizzled*) et à son co-récepteur LRP5 ou LRP6 (*low density Lipoprotein Receptor-related Protein 5 ou* 6). La liaison de WNT entraine alors le recrutement de la protéine DVL (*DisheVeLled*) qui conduit à la phosphorylation de LRP et à l'activation et recrutement du complexe AXIN sur le récepteur. La β-caténine qui n'est donc plus phosphorylée par ce complexe, est alors stabilisée dans le cytoplasme où elle s'accumule puis atteint le noyau pour former un complexe avec TCF/LEF et activer l'expression des gènes cibles (Figure 19) (MacDonald *et al.* 2009).

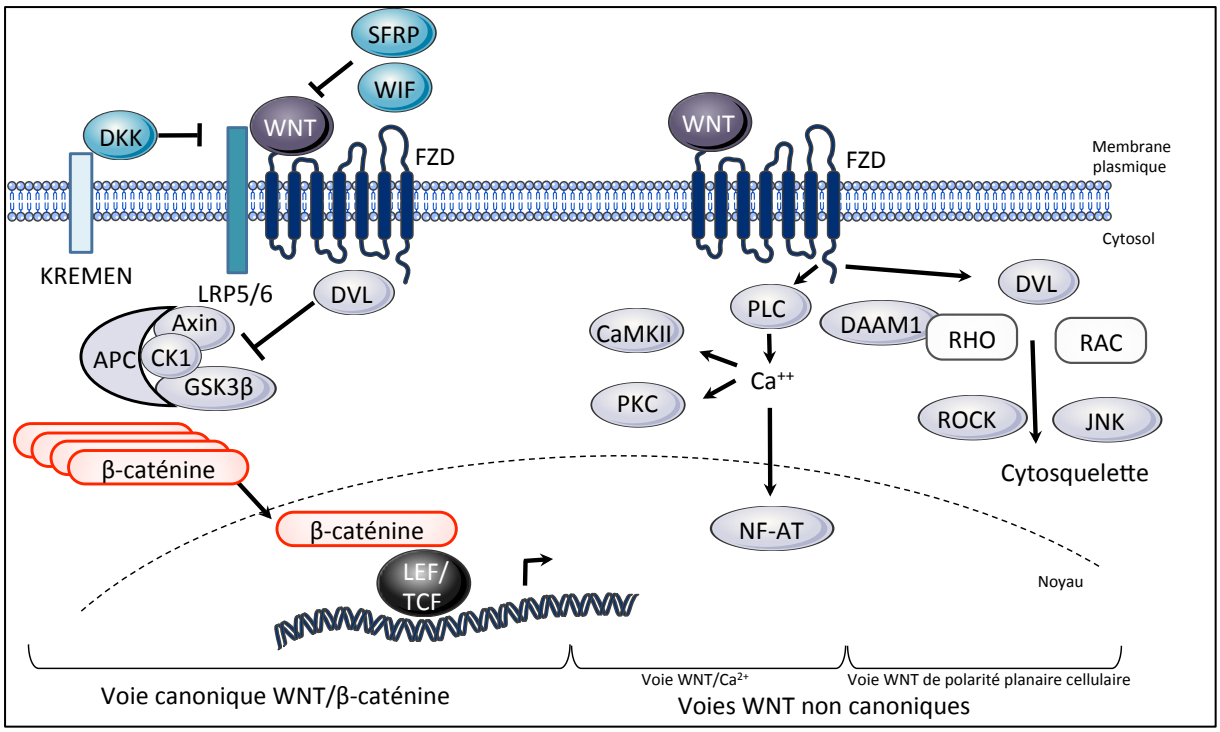


Figure 19. Schéma de la voie WNT.
L'activation de la voie canonique WNT/β-caténine conduit *in fine* à l'entrée de β-caténine dans le noyau où elle sert de co-activateur aux TCF/LEF pour l'activation des gènes cibles. Des protéines secrétées comme SFRP (*Secreted Frizzled-related Protein*) ou WIF (*Wnt Inhibitory Factor*) antagonisent ou modulent cette voie. DKK (*DicKKopf*) est un autre antagoniste spécifique de cette voie. A côté de cette voie WNT/β-caténine, la liaison de WNT à son récepteur FZD active deux voies non canoniques : la voie WNT/calcium et la voie PCP. Dans la première, la PLC (*PhosphoLipase C*) est activée et conduit au relargage de calcium Ca^{2+} par le réticulum endoplasmique. L'augmentation des concentrations de Ca^{2+} conduit à l'activation de la PKC (*Protein Kinase C*), de CaMKII (*Ca^{2+}/calModulin-dependent protein Kinase II*) et de NF-AT (*Nuclear Factor of Activated T-cells*). Cette voie WNT/calcium régule l'adhésion cellulaire, la migration et la séparation des tissus embryonnaires. D'autre part, dans la voie PCP, DVL s'associe à DAAM1 (*Dishevelled-Associated Activator of Morphogenesis 1*) qui active alors RHOA puis ROCK (*RhO-assoCiated Kinase*) qui est un régulateur majeur du cytosquelette. DVL peut aussi s'associer à RAC1 (*RAs-related C3 botulinum toxin substrate*) qui active JNK(*c-Jun N-terminal Kinase)* conduisant à la polymérisation d'actine. D'après Angers *et al.* 2009.

III-2. Altérations génétiques et anomalies d'expression de la voie WNT dans les tumeurs

Dans de nombreux tissus, l'activation inappropriée de la voie WNT a été associée à l'initiation et/ou la progression tumorale. Des mutations ou dérégulations d'expression de composants de la voie WNT/β-caténine sont retrouvées dans de plusieurs types de cancers. Parmi les mutations les plus fréquentes de cette voie, on trouve : des mutations pertes de fonction d'*APC* et d'*AXIN* et des mutations gain de fonction de *CTNNB1* (gène codant pour la β-caténine) (Figure 20). Ces mutations conduisent généralement à la stabilisation inappropriée de la β-caténine dans le noyaux (Klaus *et al.* 2008). Il a également été décrit des surexpressions de WNT, FZD ou DVL.

Récemment, des transcrits de fusion impliquant des membres de la famille des R-spondines, les gènes *RSPO2* (*R-SPOndin 2*) et *RSPO3* (*R-SPOndin 3*), ont été mis en évidence dans 10% des tumeurs du colon (Seshagiri *et al.* 2012). Ces fusions récurrentes de gènes *RSPO* sont mutuellement exclusives des mutations d'*APC* et conduisent à la surexpression de *RSPO* et donc à l'activation de la voie WNT. En effet, en 2004, la famille des R-spondines a été identifiée comme étant une famille d'agonistes WNT qui potentialise la réponse de la cellule à de faibles doses d'agonistes et facilite la stimulation la voie WNT/β-caténine et de la voie PCP (Niehrs *et al.* 2012) (Figure 20).

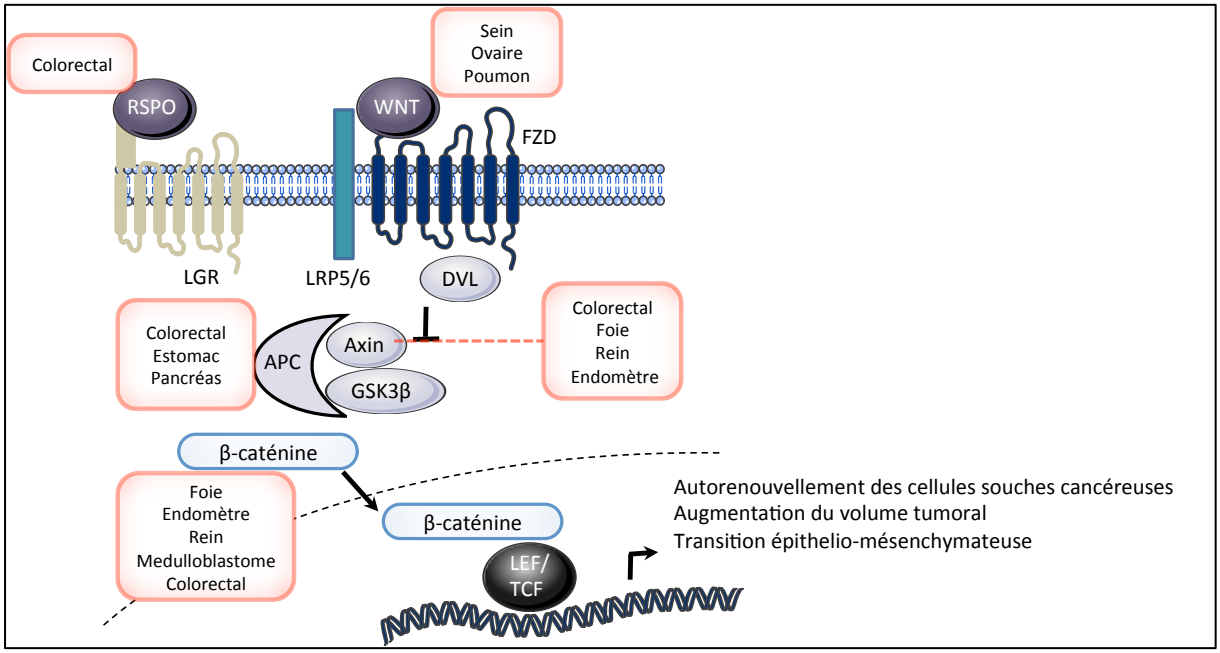


Figure 20. Principaux composants de la voie WNT/β-caténine mutés dans les cancers.
Divers types de tumeurs présentent des altérations de la voie WNT/β-caténine parmi lesquelles figurent le cancer colorectal, du sein, de l'ovaire, du poumon, de l'estomac, du pancréas, du foie, du rein, de l'endomètre et les médulloblastomes.

III-3. Rôle de la voie WNT dans la régulation du pool de cellules souches somatiques

La plupart des tissus possèdent des cellules souches somatiques (CSS) aux propriétés (i) d'auto-renouvellement et (ii) de différenciation en différents types de progéniteurs (Reya *et al.* 2005). Classiquement, les CSS se différencient en progéniteurs qui se différencient à leur tour en cellules matures constitutives d'un tissu. Ces CSS sont notamment nécessaires à la régénération tissulaire. La régulation du pool de CSS et de progéniteurs tissus-spécifiques dépend de la

balance entre l'autorenouvellement et engagement vers la différenciation de ces cellules. Plusieurs voies de signalisation sont impliquées dans la régulation du pool de CSS et de progéniteurs (Reya *et al.* 2005, MacDonald *et al.* 2009, Polyak *et al.* 2006). La voie WNT est un régulateur critique du pool de CSS et de progéniteurs dans différents tissus.

Plusieurs études ont montré le rôle de cette voie dans le système nerveux central et périphérique. En effet, l'activation de la voie WNT augmente la prolifération et l'expansion des progéniteurs neuronaux. A l'inverse, son inactivation conduit à une réduction du compartiment de progéniteurs (Lee *et al.* 2004 ; Chenn and Walsh 2002 ; Zechner *et al.* 2007; Wexler *et al.* 2009). En conséquence, ces études suggèrent que l'activation aberrante de la voie WNT pourrait conduire à la transformation cellulaire dans le sytème nerveux.

III-4. Rôle de la voie WNT dans la régulation du pool de cellules souches cancéreuses

Il y a quelques années, l'existence de cellules souches cancéreuses (CSC) partageant de nombreuses caractéristiques avec les CSS a été mise en évidence dans des tumeurs. Les CSC sont également capables d'auto-renouvellement, de différenciation en différents types de progéniteurs mais les CSC ont, en plus, un potentiel tumorigénique. Elles sont en effet capables de former des tumeurs, récapitulant l'hétérogénéité cellulaire de la tumeur d'origine, lors de leur implantation chez la souris immuno-déficiente. Les CSC sont une sous-population tumorale responsable du maintien de la croissance de la tumeur (Klaus *et al.* 2008 ; Visvader *et al.* 2008). Les CSC sont distinctes de la cellule tumorale d'origine. La cellule d'origine est le type cellulaire dans lequel survient le premier évènement oncogénique. De plus, les CSC ne sont pas nécessairement issues de la transformation de CSS mais peuvent dériver de progéniteurs ou de cellules plus différenciées qui acquièrent des capacités de cellules souches. De la même façon que la voie WNT est critique dans le maintien des CSS, cette voie semble essentielle à la régulation de la population de CSC dans divers types tumoraux. Par exemple, il a été montré, dans des modèles murins, que la délétion du gène de la β-caténine conduisait à disparition des CSC CD34+ et à la régression complète des tumeurs cutanées (Malanchi *et al.* 2008).

Plusieurs études ont révélées l'existence d'une population de cellules aux propriétés de cellules souches dans les neurofibromes et les MPNST (Williams *et al.* 2008 ; Joseph *et al.* 2008 ; Zheng *et al.* 2008 ; Wu *et al.* 2008). La voie WNT pourrait-elle jouer un rôle dans la régulation du pool de cette population cellulaire et plus généralement dans le maintien des tumeurs NF1 ?

III-5. Rôle de la voie WNT dans la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT)

Au cours de la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT), une cellule épithéliale polarisée devient une cellule mésenchymateuse invasive et migratoire. Ce processus est fondamental dans la progression tumorale puisqu'il contribue à l'invasion tumorale et à la dissémination métastatique (pour revue Polyak et Weinberg 2009). La voie WNT est une des voies de signalisation pouvant initier l'EMT. Il a notamment été montré que l'inhibition de GSK3β conduit à l'augmentation de la quantité de β-caténine transloquée dans le noyau où elle induit l'expression de facteurs de transcription induisant l'EMT. De nombreux facteurs de transcription induisant l'EMT ont été décrits, parmi lesquels se trouvent *SNAIL*, *SLUG*, *VIM1*, *CDH1* et *TWIST1* (Hanahan *et al.* 2011 ; De Craene et Berx 2013).

Des analyses de comparaison de profils moléculaires de cellules de Schwann normales et de cellules de Schwann de MPNST, de neurofibromes plexiformes et de MPNST ont révélé la perte des marqueurs caractéristiques de la cellule de Schwann différenciée dans les tumeurs (Levy *et al.* 2004 ; Miller *et al.* 2006). Au contraire, les cellules au sein des MPNST, tumeurs hautement métastatiques, expriment spécifiquement *TWIST1*, marqueur d'EMT (Miller *et al.* 2006). Ces données suggéraient qu'une transition Schwanno-mésenchymateuse liée à la voie WNT pouvait intervenir dans la tumorigenèse NF1.

IV- CHAPITRE 4. *SUZ12*, gène candidat pour expliquer le phénotype particulier des patients NF1 délétés

IV-1. Les grandes délétions germinales du *locus NF1* prédisposent à la survenue de MPNST

Comme de nombreuses maladies héréditaires à pénétrance complète, la NF1 se caractérise par une variabilité importante de son expression clinique, aussi bien inter- qu'intra-familiale (Sabbagh *et al*. 2009). Cette variabilité s'observe tant au niveau de la nature des manifestations cliniques qu'au niveau de la sévérité de ces manifestations et n'est pas clairement comprise. L'identification des facteurs à l'origine de cette variabilité est cruciale pour mieux comprendre la physiopathologie de la maladie, établir un pronostic de son évolution et envisager de nouveaux traitements. Afin de progresser dans la compréhension des mécanismes moléculaires sous-tendant l'expression phénotypique de la NF1, une vaste banque de données génotype-phénotype consacrée à la NF1, centralisée par le Centre de référence Maladies Rares des Neurofibromatoses (Pr. Pierre Wolkenstein, Département de Dermatologie, Hôpital Henri Mondor, AP-HP, Créteil) a été constituée. Depuis 2002, 1099 sujets atteints de NF1 appartenant à 575 familles ont été inclus. Afin d'étudier les corrélations génotype-phénotype, une caractérisation moléculaire précise des altérations du gène *NF1* chez chacun des cas index de la collection a été entreprise. L'analyse des corrélations allèle-phénotype au sein des familles de la cohorte française a permis de confirmer qu'il n'existait pas de corrélation entre la mutation *NF1* et le phénotype des patients, chez les patients présentant une mutation constitutionnelle intragénique de *NF1* (Sabbagh *et al.* 2009 ; Pasmant *et al.* 2012).

En revanche, il a été montré qu'il existait un phénotype plus sévère, incluant une dysmorphie faciale, des difficultés d'apprentissage, une hypercroissance et un risque plus élevé de développer des MPNST, chez les patients porteurs de microdélétions constitutionnelles récurrentes *NF1*. (Tableau V ; de Raedt *et al.* 2006 ; Mautner *et al.* 2010 ; Pasmant *et al.* 2010).

Tableau V. Caractéristiques cliniques particulières retrouvées chez les patients porteurs de microdélétions incluant *NF1* en comparaison aux patient portant ds mutations restreintes à NF1.

Caractéristiques cliniques	Patients non-délétés (*n*=389)	Patients délétés (*n*=58)	*P*
Excès de croissance	6.3%	30.4%	0.005
Dysmorphie faciale	10.8%	51.9%	<0.0001
Difficultés d'apprentissage	51.9%	80.0%	0.001
MPNST	3.1%	5.6%	NS

NS : Non significatif

Ce phénotype pourrait être expliqué par la co-délétion de *NF1* et d'un gène additionnel dans l'intervalle délété (syndrome de gènes contigus) (Figure 9). Jusqu'à présent, aucun gène resposanble de cette sévérité n'a été identifié.

Parmi les 14 gènes co-délétés avec *NF1*, plusieurs arguments faisaient de *SUZ12* un excellent gène candidat, car il code une sous-unité du complexe PRC2 (cf infra). En particulier, des mutations germinales de composants du PRC2 sont causales de syndromes d'hypercroissance associant également des difficultés d'apprentissage et une dysmorphie faciale proche de celle observée chez les patients NF1 délétés.

IV-2. Modifications post-traductionnelles des histones et modulation de l'expression génique

IV-2.1. Organisation de la chromatine

Dans les noyaux des cellules eucaryotes, l'organisation de l'ADN en chromatine est essentielle pour l'intégrité génomique dans l'établissement et le maintien des états d'expression des gènes à travers les divisions cellulaires ainsi que dans l'identité cellulaire (Heard E, Epigénétique et mémoire cellulaire, Leçons inaugurales du collège de France, Edition Fayard, 2013).

La chromatine consiste en l'association de l'ADN et de protéines. Les histones sont des protéines très riches en acides aminés basiques étroitement associées à l'ADN dont elles permettent la

compaction. Le complexe ADN-histone constitue les nucléosomes, unité fondamentale de la chromatine, comprenant une région centrale et une région inter-nucléosomique. La région centrale est composée de 147 pb d'ADN enroulées autour d'un octamère protéique comprenant deux copies de chacune des histones H2A, H2B, H3 et H4. La région inter-nucléosomale, de longueur variable, est caractérisée par la présence de l'histone H1 (Sarma et Reinberg 2005) (Figure 21).

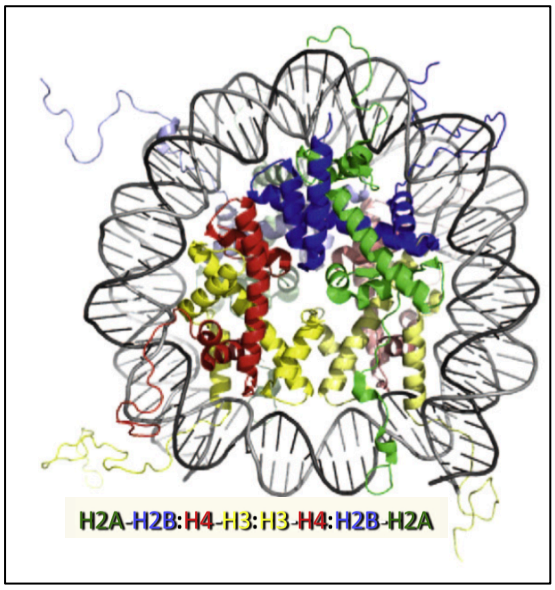


Figure 21. Structure du cœur d'un nucléosome.
Le cœur octamérique du nucléosome est constitué de quatre types d'histones différents : H2A (vert), H2B (bleu), H3 (jaune) et H4 (rouge). Chaque octamère contient deux copies de chaque histone. Les extrémités N-terminales des histones dépassent de la structure du nucléosome et sont sujettes à des modifications post-traductionnelles. Extrait de Cutter et Hayes 2015.

Le noyau est caractérisé par des domaines distincts de chromatine que l'on peut schématiquement distinguer par deux formes : l'euchromatine et l'hétérochromatine. L'euchromatine est une chromatine décondensée avec des régions transcriptionnellement actives. A l'inverse, l'hétérochromatine est une chromatine très compactée avec des régions d'ADN non-transcrit.

La chromatine, est sujette à des modifications dynamiques jouant un rôle fondamental dans la régulation de l'accessibilité de l'ADN et donc de l'établissement, du maintien et de la propagation des profils d'expression des gènes. Cette régulation inclut l'échange de variants d'histone, le remodelage des nucléosomes par des complexes de remodelage ATP-dépendant ainsi que des modifications post-traductionnelles de l'ADN et des histones (Laugesen *et al*. 2014) (Figure 22).

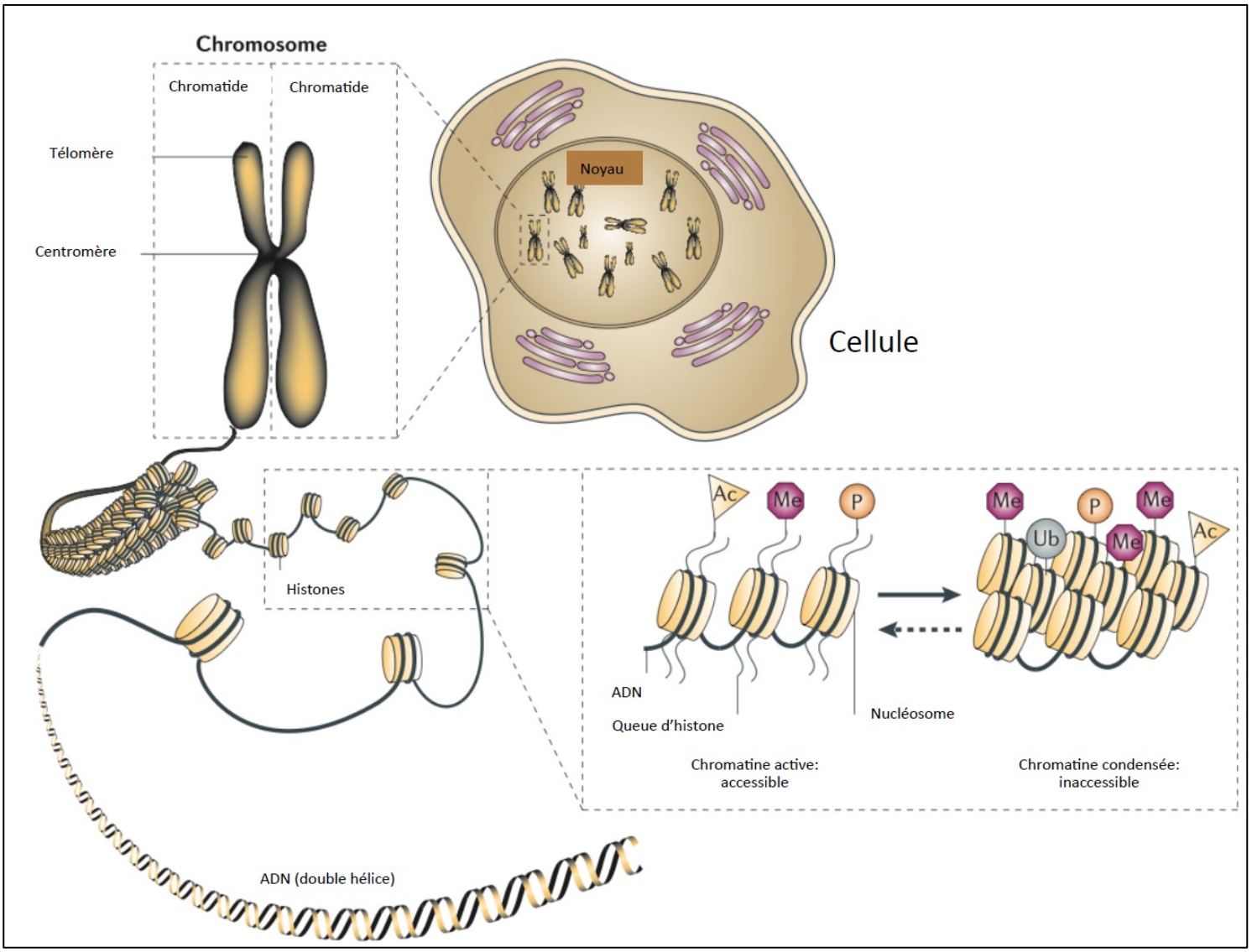


Figure 22. Modifications post-traductionnelles des histones et épigénétique.
Les changements dynamiques de la structure de la chromatine sont directement influencés par les modifications post-traductionnelles des histones principalement au niveau de leur région N-terminale. Des amino-acides spécifiques de la queue des histones sont les cibles de nombreuses modifications covalentes, incluant l'acétylation, la phosphorylation, la poly(ADP)-ribosylation, ubiquitinylation et la méthylation. Certaines de ces marques épigénétiques comme la triméthylation de la lysine 36 (H3K36me3) sont généralement associées à des régions ouvertes, activement transcrites. D'autres marques comme la triméthylation de la lysine 27 (H3K27me3) sont associées à un état chromatinien réprimé. Issu de Sparmann *et al.* 2006.

IV-2.2. Variants d'histones

Des variants d'histones peuvent être incorporés dans les nucléosomes à la place des histones majoritaires. Les variants d'H2A et d'H3 sont les plus fréquents (Figure 23). Ils sont déposés au niveau de régions spécifiques, modulent la structure et la fonction de la chromatine et sont

impliqués dans la régulation de processus cellulaires variés. Par exemple, les variants H3.3 et H3.1 ne diffèrent que de quatre acides aminés dans leur domaine globulaire. Ces résidus sont pourtant cruciaux pour leur incorporation pendant des phases distinctes du cycle cellulaire. Le variant H3.3 a été montré comme présent au niveau de *loci* transcriptionnellement actifs et son incorporation a été observée pendant toutes les phases du cycle cellulaire. A l'inverse, l'incorporation d'H3.1 est limitée à la phase S (Sarma et Reinberg 2005). Les histones H3 sont codées par différents gènes dans le génome qui sont rassemblés en cluster. Par exemple, H3.1 est codée par les gènes *HIST1H3A*, *HIST1H3B*, *HIST1H3C*, *HIST1H3D*, *HIST1H3E*, *HIST1H3F*, *HIST1H3G*, *HIST1H3H*, *HIST1H3I* et *HIST1H3J* et H3.3 est codée par les gènes *H3F3A* et *H3F3B*.

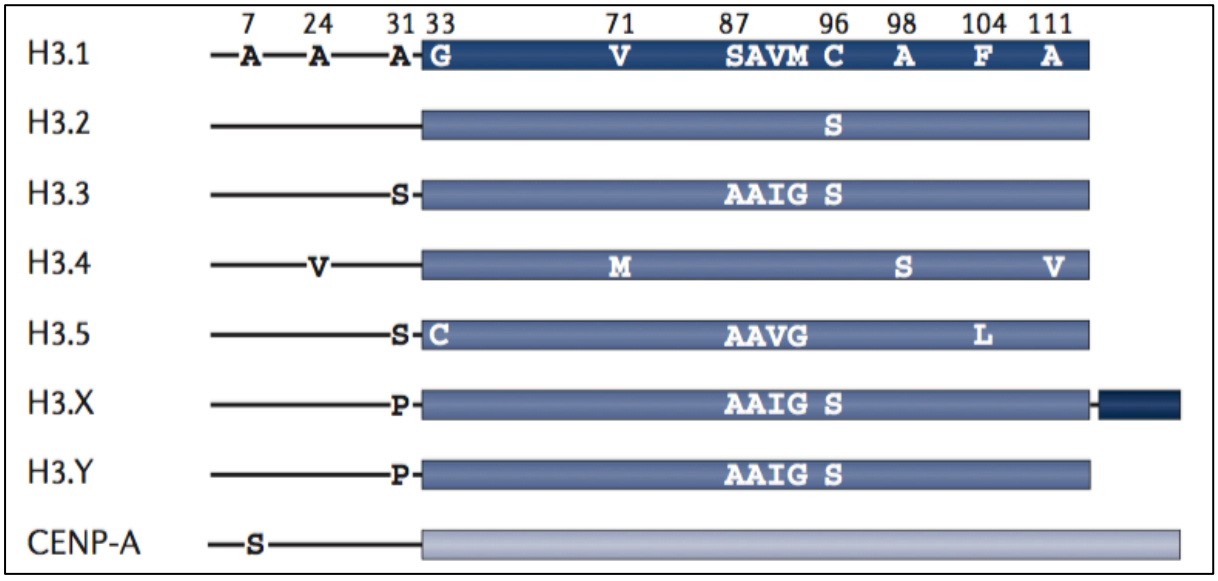


Figure 23. Représentation schématique des variants d'histones H3.
Différentes isoformes de l'histone H3 ont été rapportées. Le domaine globulaire des histones est représenté par le rectangle bleu. Les résidus d'amino-acides décrits comme spécifiquement clés à chaque variant sont notifiés. Issu de Maze *et al.* 2014.

IV-2.3. Modifications post-traductionnelles des histones

Des modifications post-traductionnelles (MPT) affectent les histones et leurs variants sur différents résidus (lysine, arginine, sérine…) principalement au niveau de leur extrémité N-terminale. Ces modifications sont dynamiques et réversibles. Elles sont effectuées par certaines enzymes dites « *writers* » qui sont capables de méthylation, acétylation, phosphorylation, ubiquitinylation… D'autres protéines appelées « *erasers* » peuvent effacer ces modifications (déméthylation, désacétylation, déphosphorylation…). Enfin, des protéines dites « *readers* » lient

ces différentes marques épigénétiques. Seules ou en combinaisons, les MPT des histones peuvent être associées à des états transcriptionnels réprimés ou actifs des gènes. Le contrôle de ces MPT joue un rôle crucial pour de nombreux processus biologiques comme la régulation du cycle cellulaire ou la réparation de l'ADN (Kouzarides *et al.* 2007) (Figure 22).

La lysine placée en position 27 de l'histone H3 est sujette à des MPTs. Elle peut notamment être méthylée par le complexe PRC2.

IV-3. Le complexe PRC2, un répresseur transcriptionnel

IV-3.1. Identification des protéines des complexes Polycomb

Initialement, les protéines PcG ont été identifiées chez la mouche *Drosophila melanogaster* comme des répresseurs transcriptionnels des gènes homéotiques *Hox* (*HOmeoboX*).

L'expression des gènes *Hox*, au cours du développement embryonnaire de la Drosophile, définit la position des structures corporelles le long de l'axe antéro-postérieur de son corps adulte (Figure 24). Les gènes Hox ont une organisation génomique particulière facilitant le contrôle de leur expression par des régulateurs transcriptionnels. Ils sont organisés en *clusters* et l'activation de chaque gène dépend de sa position au sein des *clusters* (Shah *et al.* 2010). Les gènes *Hox* sont très conservés chez la plupart des animaux pour qui le nombre de *clusters* varie selon la complexité anatomique. Les mammifères présentent quatre clusters composés de 39 gènes *Hox* chez l'humain (Figure 24) (Shah *et al.* 2010).

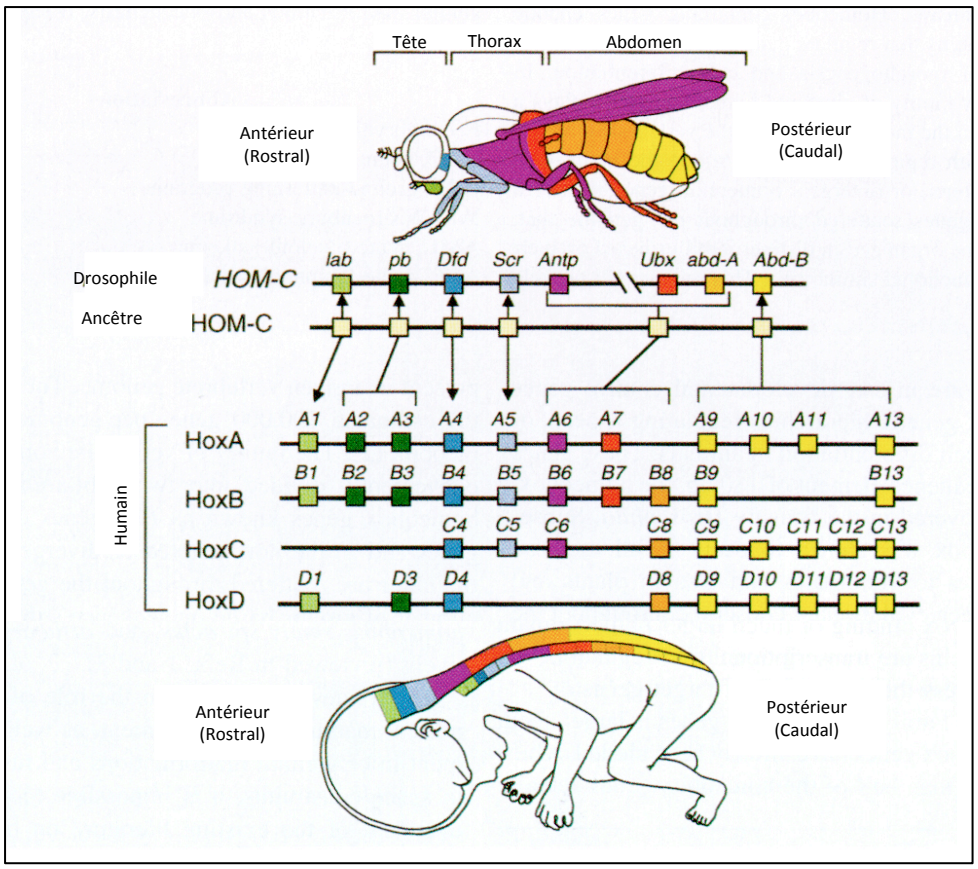


Figure 24. Organisation du locus *Hox* chez la Drosophile et l'homme.
L'expression des gènes *Hox* définit la position des segments corporels le long de l'axe antéro-postérieur. Chez les vertébrés, les gènes *Hox* sont organisés en *cluster*. D'après Mark *et al.* 1997.

L'activité antagoniste de protéines du groupe Polycomb (PcG) et des protéines du groupe Trithorax (Trx) est fondamentale pour le maintien des états d'expression réprimés ou actifs de ces gènes homéotiques pendant le développement jusqu'au stade adulte. Ces deux groupes ont des fonctions antagonistes. La balance de leurs deux activités est responsable du profil correct d'expression spatiale et temporelle des gènes *Hox*. Les protéines du groupe Trx sont généralement impliquées dans le maintien de l'activation de l'expression de ces gènes (voir Kingston et Tamkun 2014 pour revue). A l'inverse, les protéines du groupe PcG maintiennent la repression transcriptionnelle des gènes *Hox*. Chez la Drosophile, des mutations dans les gènes PcG entrainent la dé-répression des gènes *Hox* conduisant à des transformations homéotiques. Le terme « Polycomb » a été utilisé pour décrire les premières mutations PcG : *Extra-Sex Combs* (ESC) et *Polycomb* (Pc) parce que des structures sexuelles se développaient sur la deuxième et troisième paire de pattes d'une mouche adulte alors qu'elles n'apparaissent normalement qu'au niveau de la première patte (Figure 25) (Lewis *et al.* 1978).

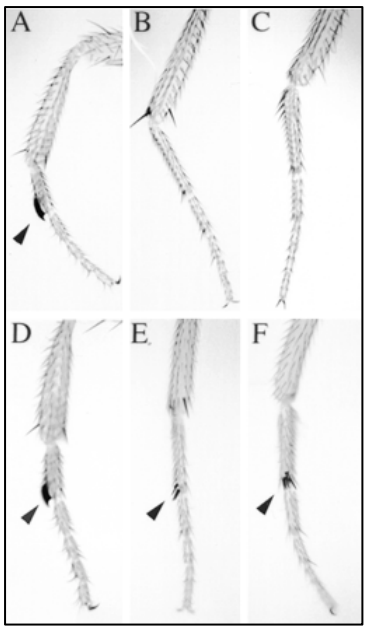


Figure 25. Phénotype du mutant *Extra-Sex Combs*.
La Drosophile sauvage males a une structure sexuelle sur la première paire de pattes (indiquée par la flèche en A). Cette structure est absente des secondes et troisième paires de pattes (B et C). Les Drosophiles males porteuses de la mutation d'un gène PcG, le gène Ph, présentent une transformation homéotique postérieur puisque la deuxième et troisième paire de pattes (E et F) sont transformées en première (D). Le nombre de strucures sexuelles par mouche est alors augmentée.
Extrait de Hodgson *et al.* 2001.

Tous les composants du groupe PcG furent donc, à l'origine, définis par le phénotype comparable de transformations homéotiques que leurs mutations entrainaient (Sparmann *et al.* 2006). Des études génomiques ont ensuite révélé que les protéines PcG ne contrôlaient pas seulement le locus des gènes *Hox* mais qu'elles régulaient l'expression de plusieurs centaines de gènes cibles dans les cellules de Drosophiles ou de mammifères. Les cibles PcG sont particulièrement enrichies en facteurs de transcription et composants de voies de signalisation au rôle majeur dans le développement (Simon et Kingston 2009). Il est maintenant connu que les protéines du groupe PcG constituent un système de maintien de la repression transcriptionnelle au rôle critique pour le développement, dans la biologie des cellules souches et dans le cancer. De plus, le rôle des machineries PcG a été particulièrement étudié dans les mécanismes d'inactivation du chromosome X et d'empreinte génomique parentale.

Les protéines du PcG s'assemblent en larges complexes multi-protéiques. Quatre complexes PcG ont été caractérisés à ce jour : le PRC1 (*Polycomb Repressive Complex 1*), le PRC2 (*Polycomb Repressive Complex 2*), le Pho-RC (*Pho-Repressive Complex*) et le PR-DUB (*Polycomb Repressive DeUBiquitinase*).

Les complexes les mieux caractérisés sont le PRC1 et le PRC2. Ils sont impliqués dans la répression de l'expression des gènes en régulant la structure de la chromatine par MPT des histones. Ainsi, le complexe PRC2 est responsable chez les mammifères de la di- et tri-méthylation de la lysine 27 de l'histone H3 (H3K27me2/3) grâce à ses sous-unités catalytiques EZH1 et EZH2 (*Enhancer of Zeste Homolog 1 ou 2*). Le complexe PRC1 mono-ubiquitinyle la lysine 119 de l'histone H2A (H2AK119ub) grâce aux ubiquitin-ligases RING1A et RING1B (*RING finger protein 1*) (Figure 26).

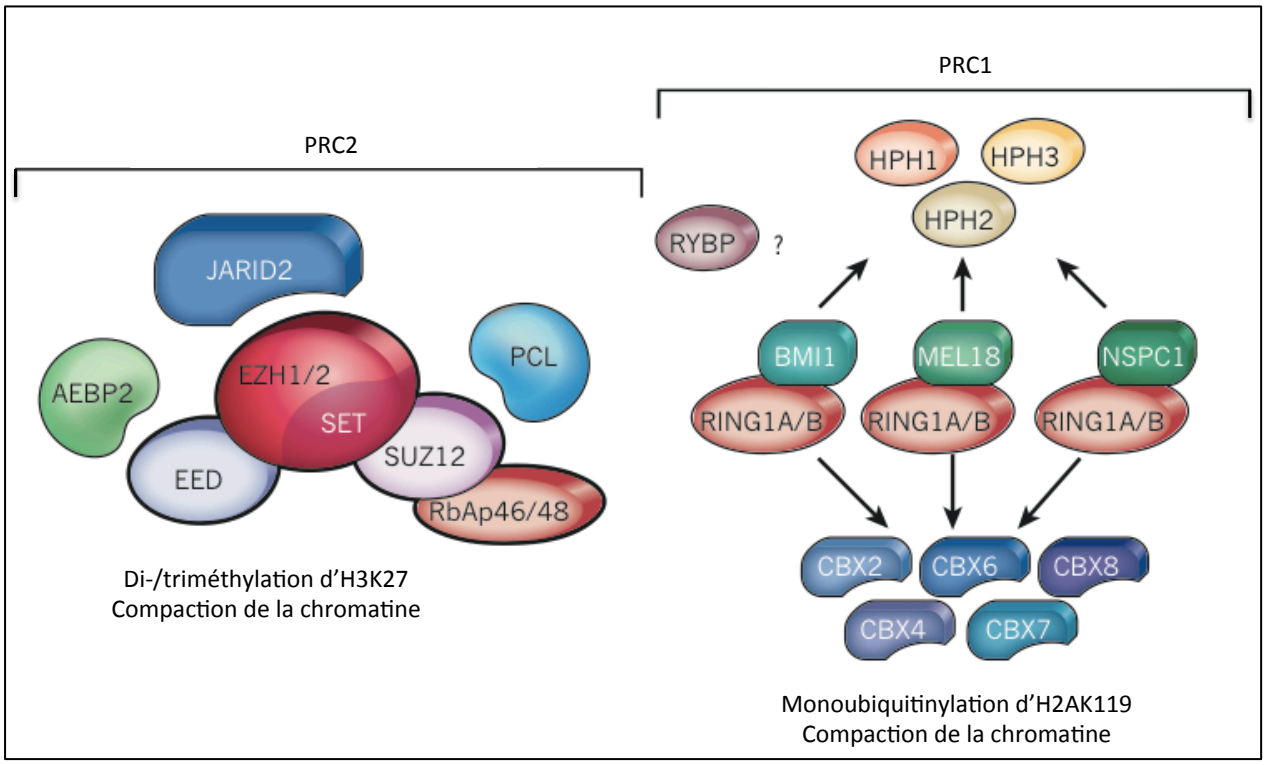


Figure 26. Complexe Polycomb PRC2 et PRC1.
Le cœur du complexe PRC2 est constitué d'EZH1/2, de SUZ12, d'EED et de RbAp46/48 (aussi appelé RBBP4/7). EZH2 est la protéine à domaine SET méthylant H3K27 uniquement quand elle est associée au sein du complexe. Les protéines AEBP2, JARID2 et PCL sont des cofacteurs. Le PRC1 canonique se compose de RING1A ou RING1B associé le plus souvent à PCGF1/NSCP1, PCGF2/MEL18 ou PCGF4/BMI1 ainsi qu'à une des trois protéines PH et une des cinq protéines CBX. Le PRC1 est responsable de la mono-ubiquitinylation de la lysine 119 de l'histone H2A (H2AK119ub). Extrait de Margueron et Reinberg 2011.

Le PRC1 et le PRC2 sont tous deux requis pour le maintient de la répression des gènes.

IV-3.2. Les complexes PRC1 et PRC2

Les mammifères possèdent un ou plusieurs homologues de chacun des composants du PRC1 et du PRC2. Chez les mammifères, il existe donc plusieurs versions de ces complexes. Le cœur du

complexe PRC2, conservé de la Drosophile aux mammifères est constitué de quatre sous-unités protéiques principales: EZH1/2, SUZ12, EED (*Embryonic Ectoderm Development*), et RbAp46/48 (*Retinoblastoma-binding protein p46/48*). La composition du PRC1 est plus variable avec un cœur composé de seulement deux protéines : RING1A/B lié avec BMI1 (*BMI1 proto-oncogene, polycomb ring finger*), PCGF2 (*PolyComb Group ring Finger 2* ou MEL18) ou PCGF1 (*PolyComb Group ring Finger 2* ou NSPC1). Le PRC1 canonique se compose de RING1A ou RING1B de PH1, 2 ou 3, d'un des cinq CBX2, 4, 6, 7 ou 8 et d'un des PCGF1/NSCP1, PCGF2/MEL18, PCGF3, PCGF4/BMI1, PCGF5 ou PCGF6/MBLR (Figure 26). Le complexe PRC1 est responsable l'apposition de la marque chromatienne H2AK119ub. De plus, quelques complexes PRC1 peuvent réguler l'expression des gènes par compaction de la chromatine, indépendamment de l'activité catalytique (Eskeland *et al.* 2010). Le composant CBX du complexe PRC1 se lie spécifiquement à H3K27me3 catalysé par le PRC2, conduisant à l'hypothèse que le PRC1 agit en aval du PRC2 pour assurer la répression transcriptionnelle.

La composition alternative de différentes sous-unités confère des fonctions distinctes aux complexes. Par exemple, le PRC2 peut être constitué d'un des deux composants orthologues d'E(Z) de la Drosophile, EZH1 ou EZH2. Le rôle d'EZH1 par rapport à celui d'EZH2 n'est pas clairement compris à ce jour. EZH1 et EZH2 présentent des profils d'expression différents (Margueron et al. 2008 ; Shen *et al*. 2008). EZH1 est présent dans les cellules en division et divisées alors qu'EZH2 n'est retrouvé que dans les cellules en division active. Le complexe PRC2 contenant EZH1 (PRC2-EZH1) est très similaire à celui contenant EZH2 (PRC2-EZH2) et ces deux complexes ont un chevauchement de leurs gènes cibles. Pourtant, le PRC2-EZH1 a une activité méthyltransférase bien moindre comparée à celle du PRC2-EZH2 (Margueron *et al.* 2008). Enfin, les souris inactivées pour *Ezh1,* contrairement à celles inactivées pour *Ezh2,* se développent normalement et sont fertiles.

L'implication du complexe PRC1 dans la tumorigenèse NF1 n'ayant pas été explorée au cours de ma thèse, ce complexe ne sera pas étudié plus en détail dans cette introduction (pour revue, Schuettengruber et Cavalli 2009 ; Klymenko *et al.* 2006 ; Scheuermann *et al.* 2010 ; Simon et Kingston 2009).

IV-3.3. Structure du PRC2

Les quatre sous-unités EZH1/2, SUZ12, EED et RbAp46/48 sont indispensables à la stabilité et à l'activité catalytique du PRC2 *in vitro*. Des cofacteurs comme AEBP2 (*AE Binding Protein 2*), les PCLs (*PolyComb Like*) ou JARID2 (*Jumonji and AT-Rich Interaction Domain containing 2*) s'associent au cœur du complexe pour moduler son activité et favoriser son recrutement sur ses gènes cibles (Margueron et Reinberg 2011) (Figure 26; Tableau VI). Il a été proposé que d'autres protéines s'associent également de façon transitoire avec le PRC2 telles que HDAC1 (*Histone DeACetylase 1*) ou SIRT1 (*SIRTuin 1*)) mais leur effet sur les fonctions du PRC2 restent à explorer.

Tableau VI. Caractéristiques des principaux composants du PRC2. Inspiré de Laugesen *et al.* 2014.

Composant du PRC2	Domaines protéiques	Fonction rapportée	KO homozygote murin	
			Phénotype	Références
EZH2	SANT ;CXC ;SET	Di-et triméthylation d'H3K27	Létalité embryonnaire avec des anomalies de gastrulation	O'Carroll *et al*. 2001
EZH1	SANT ;CXC ;SET	Di-et triméthylation d'H3K27	Phénotype normal, souris fertiles	
EED	WD40	Liaison à H3K27me3, requit pour l'activité du PRC2	Létalité embryonnaire avec des anomalies de gastrulation	Faust *et al*. 1995 ; Faust *et al*. 1998 ; Schumacher *et al*. 1996
SUZ12	RING Finger ; VEFS box ; glycin rich ; alanine rich	Stabilité du complexe, requit pour l'activité du PRC2	Létalité embryonnaire avec des anomalies de gastrulation	Pasini *et al*. 2004
RbAp46 = RBBP7	WD40	Liaison au nucléosome		
RbAp48 = RBBP4	WD40	Liaison au nucléosome		
AEBP2	Domaine en doigt de zinc	Recrutement du PRC2, potentialisation de l'activité du PRC2	Létalité embryonnaire avec absence de formation des trois feuillets embryonnaires	Kim *et al*. 2011
JARID2	ARID, JmjN, JmjC, un domaine en doigt de zinc	Recrutement du PRC2	Létalité embryonnaire avec des anomalies cardiovasculaires et de formation du tube neural	Lee *et al*. 2000 ; Motoyama *et al*. 1997 ; Takeuchi *et al*. 1995 ; Takeuchi *et al*. 1999
PCL1	Domaine Tudor et des deux domaines *PHD finger*	Recrutement du PRC2, potentialisation de l'activité du PRC2		
PCL2			Viable avec des anomalies de pénétrance incomplète incluant des transformations homéotiques	Wang *et al*. 2007
PCL3				

KO : Knock-out, SANT : wi3, Ada2, N-Cor, and TFIIIB, SET : Su(var)3-9, Enhancer of Zeste, WD40 :, RING : Really Interesting New Gene, VEFS : VRN2, EMF2, FIS2, and Su(z)12, ARID : AT-Rich Interaction Domain, JmjN, JmjC : Jumonji N et C

IV-3.3.a) Composants du cœur du PRC2

Le cœur du PRC2 canonique est constitué d'EZH2, de SUZ12, d'EED et de RbAp46/48. (Figure 27).

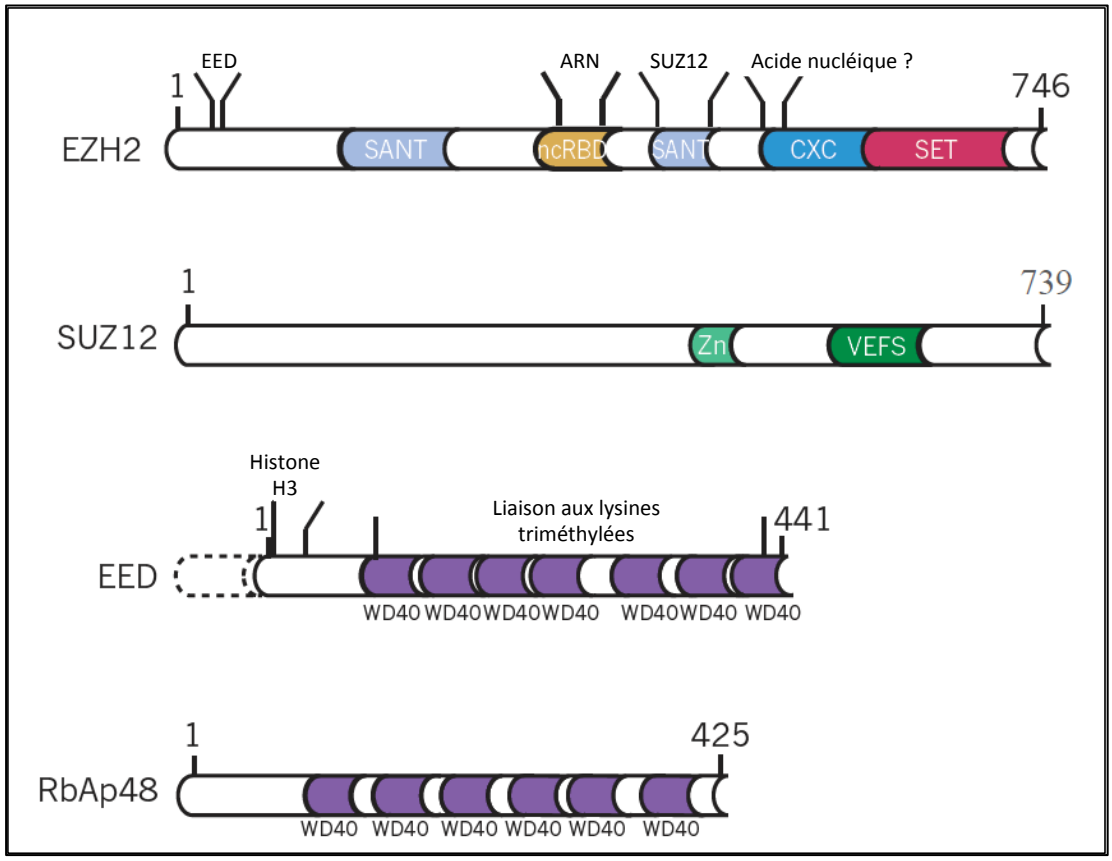


Figure 27. Représentation des quatre sous-unités protéiques principales ainsi que de leurs principaux domaines.

Les domaines caractérisés et leurs fonctions potentielles sont indiqués pour chacun des composants. Pour EED, les isoformes protéiques sont représentées en pointillés. CXC : *cysteine-rich domain*; ncRBD : *non-coding- RNA-binding domain*; SANT *: SWI3, ADA2, N-CoR and TFIIIB DNA- binding domain*; SET : *Su(var)3-9, enhancer of zeste, trithorax domain*; VEFS : *conserved among VRN2–EMF2–FIS2–SU(Z)12*; WD40 : *short ~40 amino acid motifs*. Adapté de Margueron et Reinberg 2011.

⇒ EZH2 / EZH1

EZH2/1 sont les sous-unités catalytiques du complexe PRC2. Ils possèdent notamment un domaine catalytique SET (*Su(var)3-9, Enhancer of Zeste, Trithorax*) en C-terminal qui méthyle l'histone H3 sur la lysine 27 créant ainsi une marque d'histone répressive (Figure 27). Plusieurs études décrivent la phosphorylation d'EZH2 au niveau de différents résidus sans que le rôle exact de ces phosphorylations soit clairement élucidé (Chen *et al*. 2010 ; Kaneko *et al*. 2010 ; Wu et Zang 2011). Par exemple, la phosphorylation des thréonines 354 et 487 d'EZH2 régulerait sa stabilité: elle favoriserait l'adressage au nucléosome d'EZH2 et donc sa dégradation (Wu et Zang 2011).

⇒ SUZ12

SUZ12 possède un domaine VEFS (*VRN2-EMF2-FIS2-Su(z)12*) qui permet une liaison stable à EZH2/1 favorisant l'assemblage de PRC2 (Pasini *et al*. 2004) (Figure 27). SUZ12 est également nécessaire pour la reconnaissance du nucléosome par PRC2 (Nekrasov *et al*. 2005). Enfin, il a été montré que SUZ12 se lie au domaine SET d'EZH2/1, ce qui pourrait expliquer le rôle critique de SUZ12 pour l'activité optimale du PRC2 (Ciferri *et al.* 2012).

⇒ EED

EED possède sept domaines WD40 qui lui confèrent un repliement particulier permettant l'interaction avec des protéines partenaires (Figure 27). Plusieurs isoformes d'EED ont été identifiées chez les mammifères (Montgomery *et al.* 2007) ; leur rôle n'est connu à ce jour. Des travaux récents ont montré que la protéine EED possédait une cage aromatique permettant la liaison spécifique aux lysines triméthylées et en particulier à H3K27me3 (Margueron *et al*. 2009 ; Xu *et al*. 2010). La liaison du PRC2 *via* EED à H3K27me3 augmente son activité méthyltransférase. Ce mécanisme permet de maintenir ou de propager la marque de répression H3K27me3.

⇒ RbAp46/48

RbAp46 et RbAp48, aussi connu respectivement sous le nom de RBBP7 et RBBP4 (*Retinoblastoma Binding Protein*), sont, comme EED, des protéines à domaines WD40 répétés permettant la formation d'une poche de liaison aux protéines (Figure 27). RbAp46/48 peut lier des histones et en particulier la queue de l'histone H3. RbAp46/48 est présent dans d'autres complexes modulant la structure de la chromatine tels que les complexes NURF (*ISWI- class Nucleosome Remodeling complex*), NuRD (*CHD-class RemoDeling complex*), CAF1 (*Chromatin Assembly Factor 1*) et des complexes à activité histone acétyltransférase et à activité déacétylase (Suganuma *et al*. 2008 ; O'Meara *et al.* 2012).

IV-3.3.b) Cofacteurs

Il a été montré récemment que le PRC2 est associé à plusieurs autres cofacteurs comme AEBP2 (*AE Binding protein 2*), PCL (*PolyComb Like*) ou JARID2 (*Jumonji AT Rich Interactive Domain 2*). Ces trois composants peuvent jouer un rôle dans le recrutement du PRC2 et, bien que non strictement nécessaires à son activité enzymatique, ils peuvent la moduler (Schwartz et Pirrotta 2013). Leur inactivation a des conséquences plus modestes sur le fonctionnement du complexe qu'une altération des composants principaux. Cependant, ces

éléments sont essentiels pour une activité optimale du PRC2 et de son recrutement. Le PRC2 fonctionne donc comme une holoenzyme, où la contribution de chaque composant est nécessaire pour une activité maximale (Margueron *et al*. 2011).

AEBP2 est une protéine à doigt de zinc capable d'interagir avec des composants du PRC2 pour potentialiser son activité enzymatique (Cao *et al*. 2004). AEBP2 co-localise avec le PRC2 sur certains de ses gènes cibles et peut se lier à l'ADN, ce qui suggère qu'AEBP2 pourrait agir comme une protéine recrutrice du complexe (Kim *et al*. 2009 ; Kim *et al*. 2011). De plus, des études de structure montrent qu'AEBP2 a un rôle dans la stabilisation du PRC2 et participe à la régulation allostérique dans le *silencing* des gènes (Ciferri *et al.* 2012). Très récemment, il a été montré qu'AEBP2 était exclusivement présent dans un sous-complexe de PRC2 contenant également JARID2. Dans cette même étude, l'analyse d'embryon murin homozygote pour une mutation d'*Aebp2* a révélé un phénotype homéotique Trx associé à une augmentation du niveau d'H3K27me3 au niveau des cibles du PRC2 (Grijzenhout *et al.* 2016).

JARID2 est un membre de la famille de protéines Jumonji qui catalysent la déméthylation des histones. Toutefois contrairement aux autres membres de cette famille, sa partie N-terminale est dépourvue des résidus clés nécessaires à cette activité enzymatique (Li *et al.* 2010). Il forme un complexe stable avec le cœur du PRC2 et favorise, notamment via son domaine ARID (*AT-Rich Interaction Domain*), le recrutement du PRC2 sur ses gènes cibles (Li *et al* 2010, Peng *et al.* 2009, Shen *et al.* 2009, Pasini *et al* 2010). Il a été montré récemment que Jarid2 murin était méthylé par le PRC2. Cette modification est reconnue par Eed et conduit à une activation allostérique de l'activité enzymatique du PRC2. La méthylation de Jarid2 semble être importante pour favoriser l'activation du PRC2 à un locus dépourvu d'H3K27me3 et pour l'apposition correcte de cette marque au cours de la différenciation cellulaire (Sanulli *et al.* 2015).

Chez les mammifères, **PCL1** (*alias* PHF1 (*PHD Finger Protein 1*))**, PCL2** (*alias* MTF2 (*Metal response element binding Transcription Factor 2*)) et **PCL3** (*alias* PHF19 (*PHD Finger Protein 19*)) sont les trois composants orthologues des protéines PCL de la Drosophile. Les protéines PCL jouent un rôle dans le recrutement du PRC2 sur ses gènes cibles (Walker *et al*. 2010 ; Hunkapiller *et al*. 2012) et dans la régulation de l'activité enzymatique du PRC2 (Nekrasov *et al*. 2007 ; Sarma *et al*. 2008). Ces fonctions dépendent du domaine Tudor et des deux domaines *PHD finger* que les trois protéines PCL partagent.

Des études récentes montrent que le domaine Tudor des PCL peut spécifiquement reconnaître une marque antagoniste d'H3K27me3 (H3K36me3), suggérant ainsi que les PCL peuvent aider l'adressage du PRC2 sur des gènes actifs dans le but de les inactiver (Ballaré *et al*. 2012 ; Musselman *et al*. 2012 ; Cai *et al*. 2013).

IV-3.4. Fonction

Quelles que soient les différentes protéines associées au cœur du PRC2, ce complexe conserve toujours la même activité de méthylation d'H3K27. La lysine 27 peut être mono-, di- ou triméthylée par le PRC2, chaque niveau de méthylation étant fonctionnellement distinct. La méthylation d'H3K27 est une marque très abondante avec environ 50% d'histone H3 diméthylée, 15% de triméthylée et 15% de monométhylée dans les cellules souches embryonnaires (Peters *et al.* 2003). La méthylation d'H3K27 est un processus successif (H3K27me3 résulte de la méthylation d'H3K27me2) et la marque H3K27me3 est une marque stable (Zee *et al. 2010)*. A ce jour, le PRC2 est le seul complexe connu capable de di- et triméthyler H3K27 (Figure 28).

Diverses études menées d'abord chez la mouche drosophile puis chez les mammifères, ont montré que si le PRC2 est bien un répresseur transcriptionnel, son rôle n'est pas d'établir l'état silencieux mais plutôt de le maintenir (Struhl *et al*. 1985 ; Riising *et al*. 2014). En effet, l'analyse par RNA-seq des conséquences du KO de PRC2 dans les cellules souches embryonnaires murines (mESC) ne montre pas de variation significative d'expression des gènes par rapport au profil d'expression des gènes dans des mESC sauvages. Lors de la différenciation des mESC, les analyses par RNA-seq des profils d'expression et par ChIP-seq des sites d'occupation du PRC2 à différents temps révèlent que le PRC2 n'est pas indispensable à l'initiation de la répression des gènes mais est nécessaire au maintien de leur *silencing* (Riising *et al*. 2014). Ainsi, le PRC2 n'est pas un élément conducteur d'une identité cellulaire particulière mais un gardien de cette identité ; il reconnaît les gènes non transcrits et maintient leur répression.

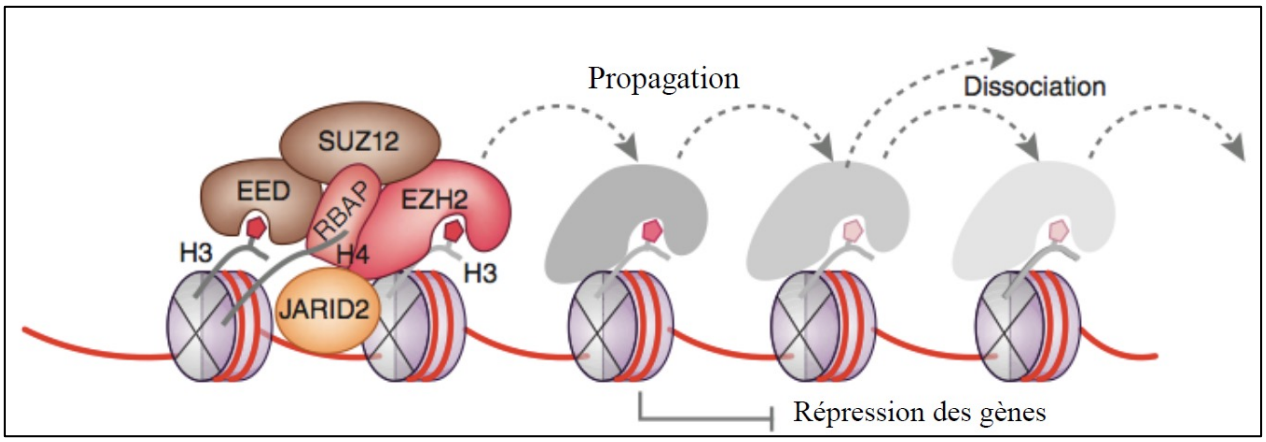


Figure 28. Méthylation d'H3K27.
Une fois recruté, le PRC2 méthyle l'histone H3 sur la lysine 27. Il reste ensuite mobile, permettant la propagation de la méthylation au delà du site de recrutement initial. Le PRC2 peut ensuite se dissocier et aller se lier à d'autres gènes cibles. Issu de Voigt et Reinberg 2013.

La marque H3K27me3 est associée à la l'hétérochromatine facultative. La forme facultative de l'hétérochromatine, en opposition à la forme d'hétérochromatine constitutive, réfère à des portions de l'hétérochromatine variables. Ainsi, les mêmes gènes peuvent être réprimés et empaquetés dans l'hétérochromatine facultative dans certaines cellules, ou bien au contraire être déréprimés dans d'autres cellules en adoptant une conformation de type euchromatique. Les plus grandes régions d'hétérochromatine constitutive sont situées à proximité des centromères et des télomères alors que les régions d'hétérochromatines facultatives contiennent des régions codantes. La marque H3K27me1 est associée à l'hétérochromatine constitutive mais est également présente au niveau de gènes activement transcrits.

IV-3.4.a) Monométhylation d'H3K27

Le mécanisme d'apparition d'H3K27me1 est controversé. Chez les plantes, H3K27 est monométhylée par deux enzymes ATRX5 et ATRX6 indépendantes du PRC2 (Jacob *et al*. 2009). Ces enzymes ne sont pas conservées chez les mammifères mais H3K27me1 est encore détectée dans leurs cellules lorsque le PRC2 est inactivé (Schoeftner *et al.* 2006 ; Pasini *et al.* 2007). Il a donc été proposé que, chez les mammifères aussi, H3K27me1 était apposée par une enzyme distincte du PRC2. Toutefois cette enzyme n'a pas été clairement identifiée.

Une étude a raporté une activité *in vitro* de monométhylation d'H3K27 par G9A (*EHMT2 (Euchromatic Histone lysine MethylTransferase 2)*) qui possède des fonctions bien établies de mono- et diméthylation d'H3K9 (Tachibana *et al.* 2001). Une étude a confirmé *in vivo* la capacité de G9A à monométhyler H3K27 (Wu *et al.* 2011). D'autres études sont cependant nécessaires pour confirmer ce rôle.

H3K27me1 peut aussi provenir de la déméthylation d'H3K27me2/3 par les déméthylases KDM6A (*lysine DeMethylase 6A* aussi appelé UTX (*Ubiquitously-transcribed TPR protein*

on the X chromosome)) et KDM6B (*lysine DeMethylase 6B* aussi appelé JMJD3 (*JmjC-Domain protein 3*)) au niveau des gènes activement transcrits (De Santa *et al*. 2007 ; Chen *et al*. 2012 ; Lan *et al*. 2007 ; Mansour *et al*. 2012).

IV-3.4.b) Diméthylation d'H3K27

Bien que le PRC1 peut lier H3K27me2 et me3 *in vitro*, il semble spécifique d'H3K27me3 *in vivo*. La marque H3K27me2 n'aurait pas de fonction directe dans le maintient de la répression génique mais ce produit intermédiaire demeure important puisqu'il est le substrat nécessaire à la formation d'H3K27me3 et pourrait également empêcher son acétylation. L'acétylation d'H3K27 est connue comme étant une marque antagoniste de la répression contrôlée par PcG et est enrichie en l'absence de PRC2 (Tie *et al. 2009)*.

IV-3.4.c) Triméthylation d'H3K27

L'enrichissement en H3K27me3 corrèle avec des gènes inactivés (Barski *et al. 2007)*. Cette observation est renforcée par le fait que les marques H3K27me3 et H3K36me3 (qui est une marque associée à l'élongation transcriptionnelle) ont des localisations distinctes (Mikkelsen *et al. 2007)*. Différents mécanismes peuvent expliquer la répression transcriptionnelle du PRC2 via l'apposition de la marque H3K27me3. La présence de cette marque contribue au recrutement de facteurs de régulation comme le PRC1. De plus, la marque de répression H3K27me3 peut aussi réguler indirectement la transcription en empêchant la liaison de protéines comme des facteurs de transcription à la chromatine par encombrement stérique.

IV-3.5. Gènes cibles

Plusieurs études pangénomiques ont décrit la localisation d'H3K27me3 dans différents types cellulaires et organismes avec quelques résultats divergents selon la méthodologie utilisée et les modèles analysés (Negre *et al*. 2006; Schuettengruber *et al*. 2009; Tolhuis *et al*. 2006). Un résultat consensuel montre que les cibles du PRC2 représentent au moins 10% des gènes des cellules souches embryonnaires (Mohn *et al*. 2008). Les cibles du PRC2 sont essentiellement des membres de réseaux de régulation transcriptionnelle impliqués principalement (mais pas uniquement) dans le développement, la différenciation cellulaire (Sauvageau et Sauvageau 2010). Chez les mammifères, le PRC2 a deux profils de liaison différents : certains domaines de grande taille (plus de 100kb) comme ceux contenant les *loci HOX*, et des domaines de plus petite taille de quelques kilobases. Au niveau des promoteurs, l'enrichissement en H3K27me3

est localisé majoritairement autour des sites d'initiation de la transcription. De plus, H3K27me3 est retrouvée dans des régions intergéniques, subtélomériques et au niveau des rétrotransposons.

IV-3.6. Recrutement

Pour comprendre comment le PRC2 régule les processus cellulaires, la connaissance des mécanismes contrôlant sa liaison aux gènes cibles est essentielle, mais ces derniers ne sont pas encore bien élucidés chez les mammifères. Les principaux composants du PRC2 ne possèdent pas un domaine spécifique de liaison à l'ADN. Ces protéines doivent compter sur d'autres facteurs qui peuvent reconnaitre des séquences d'ADN spécifiques. Nous avons vu que les cofacteurs peuvent faciliter le recrutement mais d'autres facteurs pourraient également y participer comme (i) des séquences ADN consensus, (ii) des variants d'histones ainsi que (iii) des ARN non codants (Figure 29) (Di Croce et Helin 2013 ; Simon *et al*. 2013).

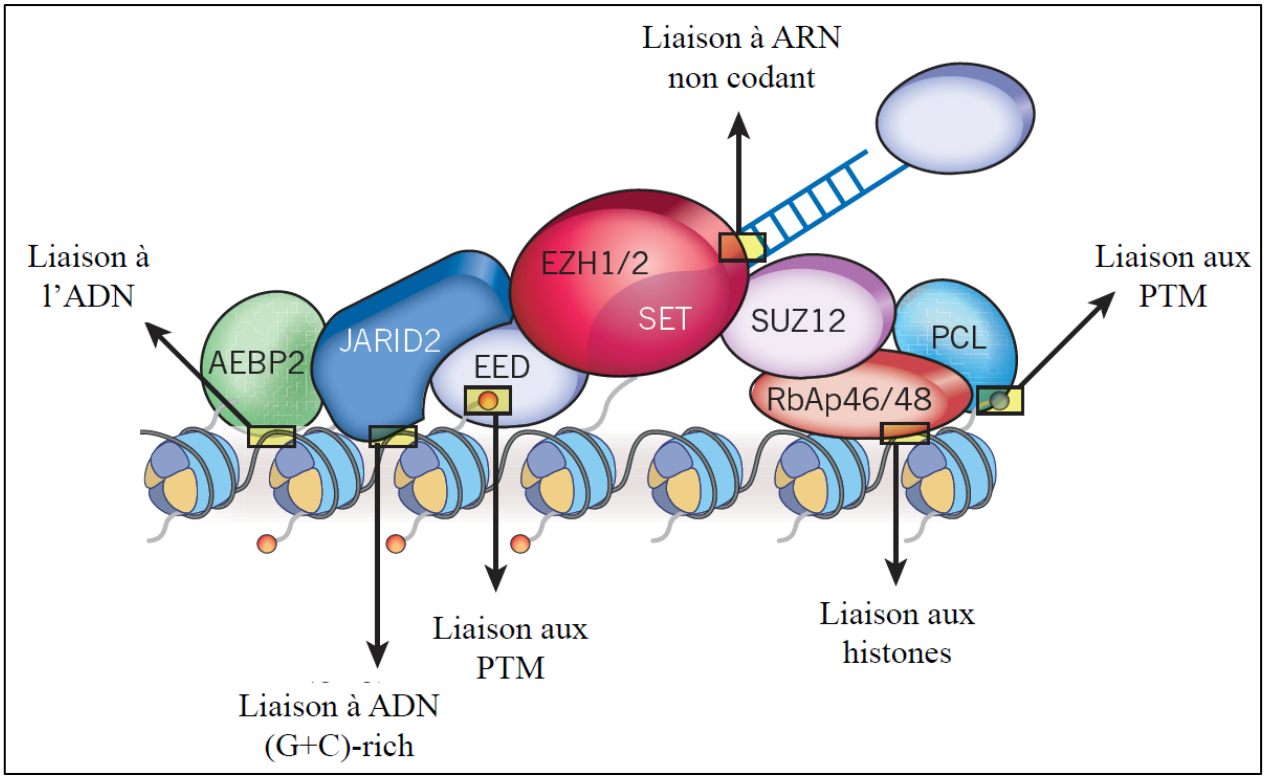


Figure 29. Principales interactions de PRC2 avec la chromatine et l'ADN.
Représentation schématique des interactions du PRC2 avec la chromatine et l'ADN pouvant expliquer son recrutement. (PTM : modification post-traductionnelle ; ncRNA : RNA non codant). Issu de Margueron et Reinberg 2011

⇒ Séquences ADN consensus

Chez la Drosophile, les protéines du PcG sont recrutées à des séquences spécifiques d'ADN appelées les « *Polycomb Responsive Elements* » (PRE). Les PRE peuvent être situés dans le

promoteur proximal de leurs gènes cibles mais aussi à des dizaines de kilobases du site d'initiation de la transcription. Plus de 350 PRE ont été identifiés dans le génome de la Drosophile (Ringrose *et al*. 2003, Schuettengruber *et al*. 2009; Schwartz and Pirrotta 2007).
Chez les mammifères, la situation semble plus complexe. A l'exception d'une étude (Jermann *et al.* 2014), aucun travaux n'ont permis d'identifier d'élément de réponse consensus (Ku *et al. 2008)* qui expliquerait le recrutement dynamique de la machinerie Polycomb. Plusieurs équipes ont cependant identifié des séquences d'ADN capables de recruter tout ou partie de la machinerie PcG lorsque ces séquences sont insérées à une région précise du génome et à une étape donnée du développement (Sing *et al.* 2009, Woo *et al.* 2010, Mendenhall *et al.* 2010, Arnold *et al.* 2013, Jermann *et al.* 2014, Riising *et al.* 2014). Elles ont, par exemple, établi que le PRC2 était localisé préférentiellement au niveau de régions enrichies en îlots CpG de gènes transcriptionnellement inactifs. Des modifications de la chromatine associées à une transcription active comme H3K27ac, H3K4me3 et H3K36me2/3 antagonise l'activité du PRC2 (Schmitges *et al.* 2011 ; Voigt *et al*. 2012 ; Yuan *et al.* 2011). La méthylation de l'ADN a également été montré comme empêchant le recrutement de PRC2 sur la chromatine (Jermann *et al.* 2014 ; Bartke *et al.* 2010).

⇒ Variants d'histone

Des données récentes suggèrent un rôle des variants d'histones dans le recrutement des protéines du PcG. Il a été montré que le variant d'histone H2A.Z co-localise avec le PRC2 sur plus de 90% de ses gènes cibles dans des cellules souches embryonnaires de souris (Creyghton *et al*. 2008). De plus, les auteurs ont montré que l'histone H2A.Z est essentielle pour la différenciation de ces cellules et pour la fixation du PRC2 sur la chromatine. A l'inverse, la colocalisation entre H2A.Z et PRC2 est perdue dans les cellules de précurseurs neuronaux, démontrant ainsi que H2A.Z n'a pas un rôle général dans la régulation de la liaison des protéines du PcG à leurs promoteurs cibles. Le variant d'histone H3.3 a également été proposé comme jouant un rôle dans le recrutement de PRC2 (Banaszynski *et al.* 2013) toutefois à nouveau, des études complémentaires sont nécessaires pour confirmer ces données.

⇒ ARN non codants

La découverte d'une interaction entre les ARN non codant (ARNnc) et le PRC2 représente un nouveau mécanisme potentiel pour le recrutement spécifique du complexe sur ses gènes cibles. La nécessité de l'expression de l'ARNnc *XIST* (*X-Inactive Specific Transcript*) pour la

déposition d'H3K27me3 lors de l'inactivation du chromosome X est à la base de cette hypothèse (Plath *et al*. 2003 ; Silva *et al*. 2003). Ultérieurement, il a été proposé qu'une interaction directe entre *XIST* et le PRC2 permettrait le recrutement au niveau du chromosome X inactif (Zhao *et al*. 2008 ; Kohlmaier *et al*. 2004). De façon similaire, l'ARNnc *HOTAIR* (*HOX Antisense Intergenic RNA*) *HOTAIR* lierait le PRC2 et le dirigerait vers certaines régions du génome (Gupta *et al*. 2010 ; Tsai *et al*. 2010).

Il a également été montré qu'*ANRIL (Antisense Non-coding RNA in the INK4 Locus)*, un long ARNnc identifié par l'équipe en 2007, participait directement à la répression transcriptionnelle du *locus CDKN2A/B* en recrutant la machinerie Polycomb (Pasmant *et al.* 2011 ; Yap *et al.* 2010) (Figure 30). Au niveau de PRC2, *ANRIL* interagirait avec SUZ12 (Yap *et al.* 2010 ; Kotake *et al.* 2011) (Figure 30).

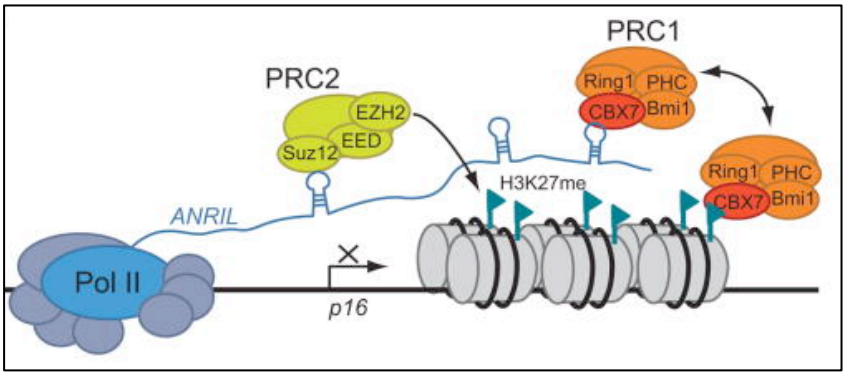


Figure 30. ANRIL et PRC2.
L'interaction de SUZ12 avec le long ARNnc *ANRIL* permettrait le recrutement du PCR2. La baisse d'expression d'*ANRIL* et l'inactivation du PRC2 pourraient avoir des conséquences similaires dans la tumorigenèse. D'après Yap *et al.* 2010.

Or une étude d'association ciblée sur données familiales (*Family-Based Association Study, FBAT*) avait permis de montrer qu'un SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) du gène *ANRIL* localisé en 9p21.3 était associé à une baisse de l'expression d'*ANRIL* et à un nombre plus grand de neurofibromes (Pasmant *et al.* 2011). En outre, les souris porteuse de délétions homozygotes emportant *ANRIL* sont viables mais présentent un risque de 50% de développer des sarcomes (Visel *et al.* 2011).

Il est toutefois important de considérer que le rôle des ARNnc dans le recrutement de PRC2 reste controversé. Des études récentes de protéomique n'ont pas permis de confirmer l'interaction directe de *XIST* avec le PRC2 (Chu *et al.* 2015, Minajigi *et al.* 2015) et le rôle de *HOTAIR* dans la régulation en trans du *locus HoxD* n'est pas retouvé par tous (Schorderet and Duboule 2011).

IV-4.PRC2 et cancers

L'émergence des technologies haut-débit de nouvelle génération a permis la mise en évidence de mutations somatiques fréquentes au sein de nombreux gènes participant à la régulation de la structure de la chromatine dans de multiples types de cancers. Ainsi, des mutations de gènes codant des acteurs de la méthylation de l'ADN, du remodelage des nucléosomes, des modifications d'histones voire des mutations des histones-elles-même ont été identifiées, indiquant que la dérégulation de la structure chromatinienne semble être un thème récurrent au développement tumoral. Parmi ces acteurs altérés dans les cancers, le PRC2 occupe une place majeure. Diverses anomalies du PRC2 ont été mises en évidence dans différents cancers et ont fait l'objet d'une revue disponible en annexe (Annexe 1). De manière paradoxale, des anomalies gains de fonction et des pertes de fonction du PRC2 ont été rapportées. Nous allons explorer ici le rôle des divers acteurs, impliqués dans l'établissement et le maintient de la méthylation d'H3K27, dans la tumorigenèse (Figure 31).

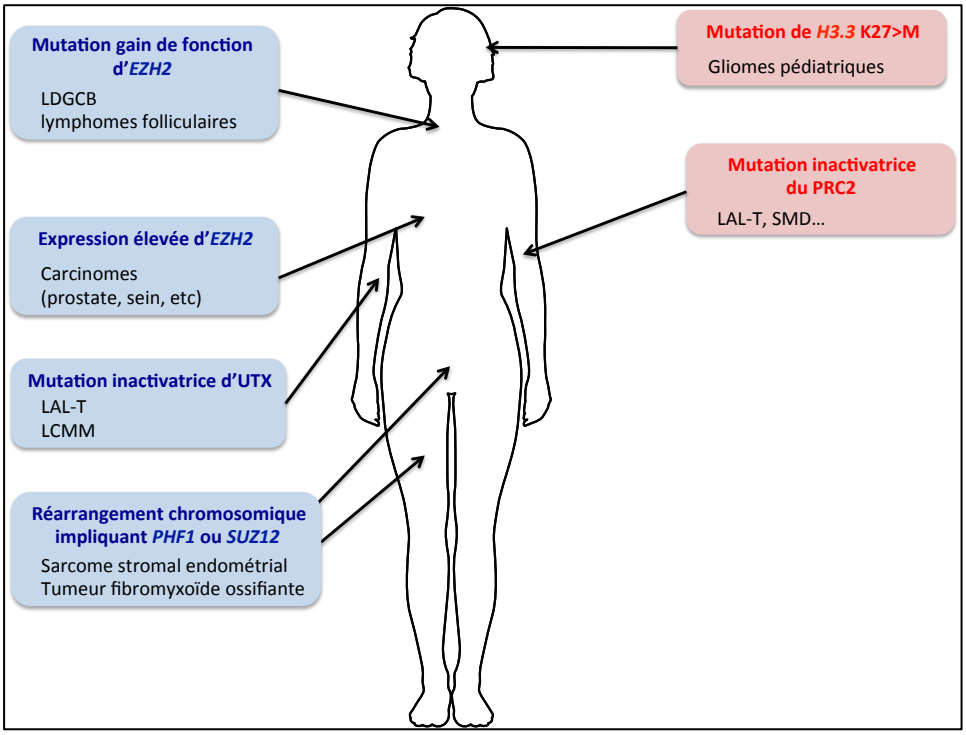


Figure 31. Les altérations des acteurs impliqués dans l'établissement et le maintient de la méthylation d'H3K27 dans différents types de cancers.
Les anomalies du PRC2 rapportées comme conduisant globalement à un gain de méthylation d'H3K27 sont représentées en bleu et les anomalies conduisant globalement à une perte de méthylation d'H3K27 sont représentées en rouge.
LDGCB : lymphome diffus à grandes cellules B ; LAL-T : leucémie aigue lymphoïde-T ; LMMC : leucémie myélo-monocytaire chronique ; SMD : syndrome myélodysplasique.

IV-4.1. Expression élevée d'EZH2 dans les carcinomes

De nombreuses études ont montré qu'EZH2 était présent à des niveaux d'expression très élevés dans différents types de carcinomes dont ceux de la prostate et du sein (voir Chase et Cross 2011 pour une revue complète sur le sujet). De plus, dans plusieurs types de carcinomes, des forts niveaux d'expression d'*EZH2* ont été associés à un mauvais pronostic. Plusieurs études suggèrent que l'expression aberrante d'*EZH2* dans les carcinomes maintient la répression de *loci* suppresseurs de tumeurs et notamment du locus *INK4A/ARF* (Figure 32, Bracken *et al.* 2007 ; Chen *et al.* 2009 ; Gil et Peters 2006).

Cependant, l'augmentation du niveau d'EZH2 dans les tumeurs ne se traduit pas nécessairement par une augmentation globale du niveau d'H3K27me3, ce qui a conduit plusieurs auteurs à proposer qu'EZH2 pourrait avoir une action indépendante du PRC2 (Lee *et al.* 2011 ; Xu *et al.* 2012). De surcroit, bien qu'une étude ait initialement observé des amplifications et gains du locus *EZH2* (Bracken *et al.* 2003), les analyses systématiques du nombre de copies à l'échelle du génome n'ont pas permis de confirmer ces résultats.
Il a été montré récemment, grâce à l'exploration de modèles murins et humains, que l'expression élevée d'*EZH2* dans les cancers était plutôt une conséquence, et non une cause, de la tumorigenèse (Wassef *et al.* 2015). Ainsi, l'expression élevée d'*EZH2* est la conséquence d'une prolifération cellulaire accrue afin d'assurer l'homéostasie d'H3K27me3. Ce processus est imparfait dans le cancer du sein dans lequel une expression relative insuffisante d'*EZH2* par rapport au taux de prolifération, et donc un niveau insuffisant d'H3K27me3 dans les cellules, est associée à un mauvais pronostic (Figure 32). Il a également été mis en évidence que l'activité altérée d'*EZH2* favorisait une instabilité génomique et que les changements transcriptionnels consécutifs à la perte d'*EZH2* étaient majoritairement irréversibles.

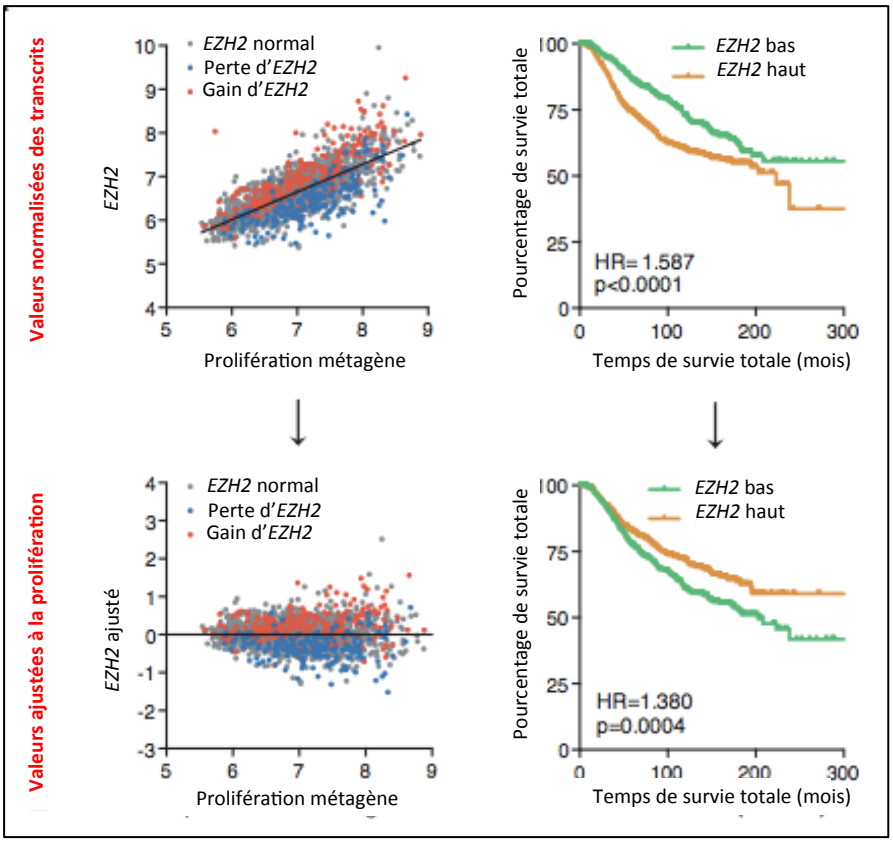


Figure 32. Evaluation de la valeur pronostique du niveau d'expression d'*EZH2* indépendamment de la prolifération dans les cancers du sein humains.
Le niveau d'expression du gène *EZH2* est ajusté à un métagène de prolifération (graphes de gauche). L'expression d'EZH2, ajustée à la prolifération, est alors négativement corrélée à la survie (graphes de droite). Ceci suggère que, contrairement à ce qui avait été décrit précédemment, la faible expression relative d'*EZH2* par rapport à la prolifération cellulaire (et donc un niveau insuffisant d'H3K27me3) est associée à un mauvais pronostic dans le cancer du sein. HR : Hazard Ratio ; Extrait de Wassef *et al.* 2015.

IV-4.2. Remaniements chromosomiques impliquant des acteurs du PRC2 dans des tumeurs endométriales et les tumeurs fibromyxoïdes ossifiantes

La présence récurrente de réarrangements chromosomiques impliquant des membres du PCR2 a été identifiée dans des tumeurs endométriales et des tumeurs fibromyxoïdes ossifiantes. Elles resultent en l'expression de proteines de fusion entre des gènes codant pour les sous-unités de PRC2 et un facteur de transcription suggerant que le recrutement aberrant de PRC2 pourrait être un élément clé dans ce processus de tumorigenèse.

IV-4.2.a) Tumeurs endométriales

Des translocations chromosomiques récurrentes sont fréquemment mises en évidence dans des tumeurs stromales endométriales (TSE) qui sont un groupe hétérogène de tumeurs rares à plusieurs degrés de malignité. Ce groupe de pathologie a été récemment sous-divisé par l'organisation mondiale de la santé en plusieurs classes comprenant les nodules stromales de l'endomètre (NSE), les sarcomes stromales endométriales de bas grade (SSE-bg) et les SSE

de haut grade (SSE-hg) (Conklin *et al.* 2014). La plupart des cas de translocations récurrentes conduisent à la génération de transcrits de fusion impliquant un membre du PRC2.

Le premier transcrit de fusion à avoir été identifié est *JAZF1 (JAZF zinc finger 1)*/*SUZ12* (Koontz *et al.* 2001). Une revue de la littérature permet de dénombrer la présence de ce transcrit de fusion dans 75% des NSE, dans 45% des SSE-bg et dans 14% des SSE-hg (Hrzenjak *et al.* 2016). Le gène *JAZF1* possède des motifs à doigt de zinc qui permettent sa liaison à l'ADN et code un facteur de transcription impliqué dans la répression transcriptionnelle. Les points de cassure de *JAZF1* et *SUZ12* conduisant à leur fusion sont très conservés. Le pourcentage important de TSE présentant la fusion *JAZF1*/*SUZ12* et la conservation du point de cassure sont des arguments suggérant que cette translocation joue un rôle important dans la tumorigenèse. Cependant, la fonction de la fusion de ces deux gènes dans le processus tumoral des TSE n'est pas connue. La seule étude fonctionnelle du rôle de cette fusion est celle de Li *et al.* qui rapportent que l'introduction d'un vecteur *JAZF1/SUZ12* dans des cellules HEK-293 inhibe l'apoptose (Li *et al.* 2007).

Plus récemment, des transcrits de fusion impliquant un autre membre du PRC2 ont été mis en évidence dans les TSE. Ainsi, l'existence des transcrits de fusion *JAZF1*/*PHF1*, *EPC1 (Enhancer of PolyComb homolog 1)*/*PHF1* et *MEAF6 (MYST/Esa1 Associated Factor 6)*/*PHF1* a été rapportée (Micci *et al.* 2006 ; Panagopoulos *et al.* 2012). Ces transcrits de fusion impliquant *PHF1* sont présents dans 6 à 11% des SSE-bg. EPC1 et MEAF6 appartiennent à des complexes d'acétylation d'histone. Bien que ces transcrits soient probablement impliqués dans la régulation transcriptionelle, leur rôle exact dans la tumorigenèse des TSE n'est pas connu à ce jour.

IV-4.2.b) Tumeurs fibromyxoïdes ossifiantes

La présence de réarrangements chromosomiques impliquant *PHF1* a été mise en évidence dans des tumeurs fibromyxoïdes ossifiantes (TFMO) (Gebre-Medhin *et al.* 2012 ; Endo *et al.* 2013 ; Antonescu *et al.* 2014)). Les TFMO sont des tumeurs rares d'origine histologique incertaine. Parmi les réarrangements décrits, des translocations récurrentes générant les transcrits de fusion *EP400 (E1A binding Protein p400)/PHF1*, *MEAF6/PHF1* et *EPC1/PHF1* ont été identifiées. Comme pour les TSE, les conséquences exactes de ces réarrangements et leur rôle dans la tumorigenèse des TFMO ne sont actuellement pas connus.

IV-4.3. Mutations gain-de-fonction d'EZH2 dans les lymphomes

Des données génétiques et biochimiques suggèrent qu'*EZH2* pourrait agir comme oncogène dans certains types de lymphomes.

Plusieurs études de séquençage d'exomes ont conduit à l'identification de mutations ponctuelles récurrentes du gène *EZH2* dans 22 % des lymphomes diffus à grandes cellules B (LDGCB) ainsi que 7 % des lymphomes folliculaires (LF) (Morin *et al.* 2010). Ces mutations sont toujours hétérozygotes et conduisent à des substitutions d'acides aminés du domaine catalytique de l'enzyme. Le résidu tyrosine en position 641 (Y641) est le plus fréquemment affecté et peut être remplacé par certains acides aminés comme la phénylalanine (49% des cas), la sérine (21%), l'asparagine (15%), l'histidine (13%) et la cystéine (2%). Ces mutations sont probablement un événement précoce dans la lymphomagenèse (Bödör *et al.* 2013).

Bien que la mutation Y641 ait été initialement rapportée comme étant à l'origine d'une perte de fonction (Morin *et al.* 2010), plusieurs travaux ultérieurs menés *in vitro* ont montré qu'elle cause un gain de fonction d'EZH2 en modifiant son activité catalytique d'une manière spécifique du substrat. En effet, cette mutation induit une augmentation de l'activité catalytique pour la transition de la monométhylation vers la diméthylation (me1>me2) et de la diméthylation vers la triméthylation (me2>me3). Cette mutation dominante conduit donc à l'accumulation d'H3K27me3 à des taux anormalement élevés, aux dépens de me2 et dans une moindre mesure de me1. Cette augmentation d'H3K27me3 est observée dans les lignées cellulaires et les échantillons de patients mutés (Sneeringer *et al.* 2010 ; Yap *et al.* 2010).
D'autre part, l'enzyme mutante n'a presque aucune activité me0>me1, pourtant indispensable à la di- et la triméthylation. Par conséquent, l'enzyme mutante est dépendante de l'activité coordonnée de l'enzyme sauvage (Sneeringer *et al.* 2010 ; Yap et al. 2010).

Bien que les conséquences moléculaires de la mutations gain de fonction d'*EZH2* restent énigmatiques, l'importance de cette mutation dans le processus de tumorigenèse a été établit *in vivo*. Des modèles murins surexprimant $Ezh2^{Y641}$ ou de *knock-in* ($Ezh2^{Y641F}$;$CD19^{Cre/+}$) montrent que la mutation gain de fonction d'*Ezh2* accélère le développement tumoral (Béguelin *et al.* 2013 ; Berg *et al.* 2014 ; Souroullas *et al.* 2016). Dans ces tumeurs, la mutation d'*Ezh2* conduit bien à une augmentation globale d'H3K27me3 mais est aussi à l'origine d'une redistribution de cette marque.

Le développement récent d'inhibiteurs spécifiques d'EZH2 offre une opportunité thérapeutique nouvelle pour ces types de lymphomes. *In vitro* comme *in vivo*, ces drogues inhibent sélectivement la prolifération des cellules tumorales porteuses de la mutation gain de fonction (McCabe *et al.* 2012 ; Knutson *et al.* 2012 ; Garapaty-Rao *et al.* 2013 ; Bradley *et al.* 2014). Trois de ces inhibiteurs, les composés CPI-1205, E7438 et GSK2816126, sont actuellement en essai clinique chez des patients atteints de LDGCB et ou de LF.

IV-4.4. Mutations d'*EZH2*, de *SUZ12* ou d'*EED* dans d'autres hémopathies

IV-4.4.a) Hémopathies myéloïdes

Dans des syndromes myélodysplasiques (SMD) et des syndromes myéloprolifératifs (SMP), des mutations somatiques perte-de-fonction des gènes *EZH2*, *SUZ12* et *EED* ont été identifiées (Ernst *et al.* 2010, Makishima *et al.* 2010, Nikoloski *et al.* 2010). *EZH2* est le gène majoritairement retrouvé muté (8% vs 3,3% pour *SUZ12/EED*). Ces mutations sont principalement hétérozygotes. En plus des cas de mutation directe du gène, l'épissage d'*EZH2* serait également altéré en conséquence de mutations affectant les gènes du *spliceosome* comme *U2AF1/SRSF2*, entrainant une baisse d'H3K27me3 (Kim *et al.* 2015).

Quelque soit le gène muté, des analyses in vitro ont montré que le résultat est une altération de l'activité enzymatique du PRC2, la perte en générale partielle de la marque H3K27me3 et en conséquence, la dé-répression potentielle de gènes cibles du PRC2 (Figure 31).

La présence d'une mutation somatique d'*EZH2* est un facteur prédictif de mauvais pronostic en terme de survie globale dans les SMD, pourtant sans augmentation du risque de transformation en leucémie aigüe myéloïde (Bejar *et al.* 2011, Sashida *et al.* 2014). Ces données suggèrent un rôle différent du PRC2 dans les hémopathies myéloïdes chroniques et aigües, d'autant que seules de très rares mutations d'*EZH2* ont été observées dans des leucémies aigues myéloïdes. La perte de fonction d'*Ezh2* seule ou en association avec *Runx1* ou *Tet2* suffit à la survenue de SMD et SMP chez la souris, suggérant cette fois une fonction suppresseur de tumeur d'EZH2 dans les hémopathies myéloïdes (Sashida *et al.* 2014, Muto *et al.* 2013, Mochizuki-Kashio *et al.* 2015).

Récemment, quatre patients parmi 100 dans une première étude et deux patients parmi 78

dans une deuxième étude décrivent des mutations ponctuelles d'*EZH2* homozygotes puisqu'associées à une monosomie 7 dans les JMML (Stieglitz *et al.* 2015 ; Caye *et al.* 2015).

IV-4.4.b) Hémopathies lymphoïdes

La présence de mutations perte de fonction et de délétions des gènes *EZH2*, *SUZ12* et *EED* a été mise en évidence dans des leucémies aigues lymphoblastiques T (LAL-T) (Ntziachristos *et al.* 2012, Zhang *et al.* 2012). Là encore, *EZH2* est le gène majoritairement muté et le plus souvent à l'état hétérozygote. L'inactivation du PRC2 a été montrée comme impliquée dans la transformation des cellules leucémiques notamment via son interaction fonctionnelle avec *NOTCH1* (Ntziachristos *et al.* 2012). L'inactivation d'*Ezh2* dans les cellules souches hématopoïétiques est suffisante pour induire une LAL-T agressive chez la souris avec une pénétrance quasi-complète, suggérant un rôle causal de la dérégulation d'EZH2 dans la leucémogenèse T (Simon *et al.* 2012). Dans les cellules leucémiques, le niveau d'H3K27me3 est nettement diminué.

IV-4.5. Mutations de la lysine 27 (K27) dans les gliomes de haut grade (GHG)

Très récemment, il a été montré que des altérations génétiques ciblent également les histones sur des résidus (i) directement sujets à des MPT ou (ii) dont la mutation peut affecter des modifications avoisinantes. Ainsi, des mutations récurrentes substituant la lysine 27 en méthionine (*p.Lys27Met = H3K27M*) au sein de différents variants de l'histone H3 ont été identifiées dans les gliomes (Schwartzentruber *et al.* 2012, Wu *et al.* 2012). Ces mutations sont présentes à des taux très élevés dans certains gliomes pédiatriques de haut grade (GPHG): par exemple, environ 80% des gliomes infiltrant du tronc cérébral (DIPG) présentent une mutation *p.Lys27Met*. La substitution *p.Lys27Met* survient exclusivement dans trois des seize gènes d'histone H3. En effet, elle a lieu dans le gène *H3F3A* codant le variant H3.3 ainsi que dans le gène *HIST1H3B* codant le variant H3.1. De plus, de rares cas de mutations *p.Lys27Met* dans le gène *HIST1H3C* codant le variant H3.1 ont été rapportés. De façon surprenante, aucune altération génétique n'a été identifiée au sein de gènes codant les protéines responsables de MPT de K27 dans ce type de tumeurs. Pourtant des mutations affectant des modificateurs de toutes les autres lysines de l'extrémité N-terminale de l'histone H3 (K4, K9, K18 ou K36) ont été décrites dans ces tumeurs (Wu *et al.* 2014).

La mutation *H3K27M* définit un sous-groupe de GHG cliniquement distinct. En effet, ces GHG présentant une mutation *H3K27M* se développent dans une localisation anatomique bien précise au sein du système nerveux central (principalement dans les structures de la ligne médiane comme le thalamus, le tronc cérébral ou le cervelet) et majoritairement chez des patients jeunes (Figure 33). Ils se distinguent également par un profil transcriptionnel et un profil de méthylation particuliers (Sturm *et al.* 2012). Il semblerait que la mutation H3K27M soit un événement précoce dans le développement tumoral et soit associée à d'autres mutations par exemple dans les gènes *TP53* ou *ACVR1* (*ACtiVin A Receptor type 1*) (Nikbakht *et al.* 2016). En revanche, la mutation *H3K27M* est mutuellement exclusive des mutations *H3G34* et *IDH1* qui caractérisent deux autres sous-groupes de GHG.

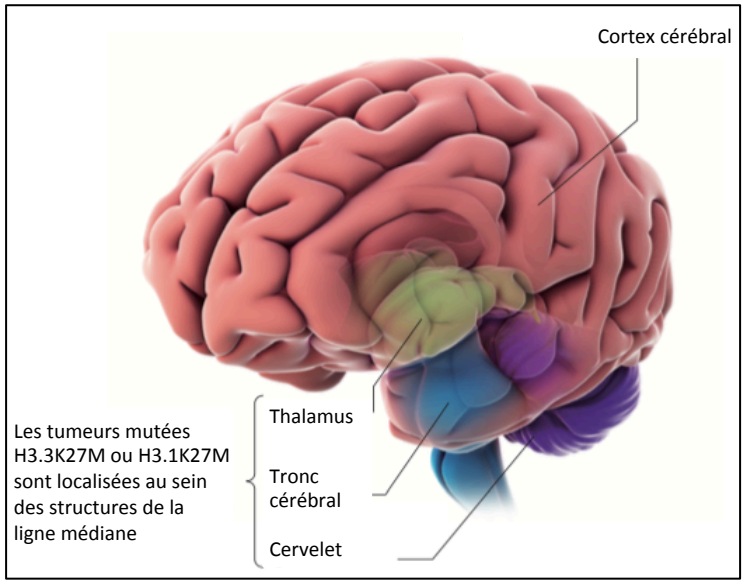


Figure 33. Régions cérébrales dans lesquelles surviennent sélectivement les mutations H3K27M.
Les mutations H3K27M sont retrouvées sélectivement dans les GHG se développant au niveau de la ligne médiane du système nerveux central c'est-à-dire au niveau du thalamus, du tronc cérébral et du cervelet. Extrait de Jones et Baker 2014.

En outre, les DIPG porteurs de mutations des gènes *H3F3A* et *HIST1H3B* semble se distinguer sur le plan phénotypique et pronostic. Les DIPG mutés *H3F3A* ne répondent pas à la radiothérapie, rechutent plus précocement et métastasent plus fréquemment que ceux mutés *HIST1H3B* qui sont, quant à eux, caractérisés par un âge plus précoce au diagnostic et une survie augmentée (Castel *et al.* 2015).

Les analyses *in vitro*, *in vivo* et structurelles des conséquences fonctionnelles des mutations hétérozygotes H3.3K27M et H3.1K27M montrent un effet dominant négatif conduisant à un recrutement aberrant et à la séquestration du PRC2 au niveau des histones mutantes ainsi qu'à l'inhibition de l'activité enzymatique d'EZH2 (Lewis *et al.* 2013, Venneti *et al.* 2013, Bender

et al. 2013, Chan *et al.* 2013, Justin *et al.* 2016). Elles sont donc à l'origine d'une diminution globale de l'activité de di- et triméthylation, alors même qu'elles n'affectent qu'une minorité du pool d'histone H3. Ces mutations ont pour conséquences une réduction globale du taux d'H3K27me3 mais aussi une redistribution de cette marque conduisant à l'enrichissement local d'H3K27me3 au niveau de certains *loci*. La redistribution d'H3K27me3 est à l'origine de modifications d'expression de gènes jouant un rôle dans les processus de tumorigenèse.

L'établissement récent d'un modèle de Drosophile pour la mutation H3.3K27M montre une réduction massive de la méthylation d'H3K27, la dé-répression des gènes cibles du PRC2 et des anomalies du développement, phénocopiant la perte de fonction du PRC2 (Herz *et al.* 2014).

Des approches thérapeutiques ont été proposées sur la base de ces mutations, toutefois leur pertinence reste à confirmer (Ramaswamy *et al.* 2014, Hashizume *et al.* 2014, Funato *et al.* 2014).

IV-4.6. Mutation des déméthylases d'H3K27 : UTX et JMJD3

Des mutations somatiques perte-de-fonction d'*UTX* ont été rapportées dans plusieurs types de tumeurs comme dans le myélome multiple, le cancer de l'œsophage, du rein ou de la vessie (Van Haaften *et al.* 2009, Gui *et al.* 2011). Des mutations d'*UTX* sont retrouvées en particulier dans les tumeurs hématopoiétiques. Ainsi, elles sont décrites dans 10% des leucémies myélomonocytaires chroniques (LMMC) (Jankowska *et al.* 2011) et dans 14% LAL-T (Ntziachristos *et al.* 2014, Van des Meulen *et al.* 2015). Dans les LAL-T, un hotspot de mutation dans le domaine catalytique Jumonji-C de la protéine a été noté. Toujours dans cette pathologie, les mutations n'ont été rapportées que chez des patients de sexe masculin. Il est intéressant de noter que le gène *UTX* est localisé sur le chromosome X et échappe à l'inactivation du X dans certains tissus chez la femme (Greenfield *et al.* 1998). L'inactivation complète d'UTX est donc un événement plus rare chez les femmes que chez les hommes puisqu'elle nécessite deux évènements mutationnels (Figure 34).

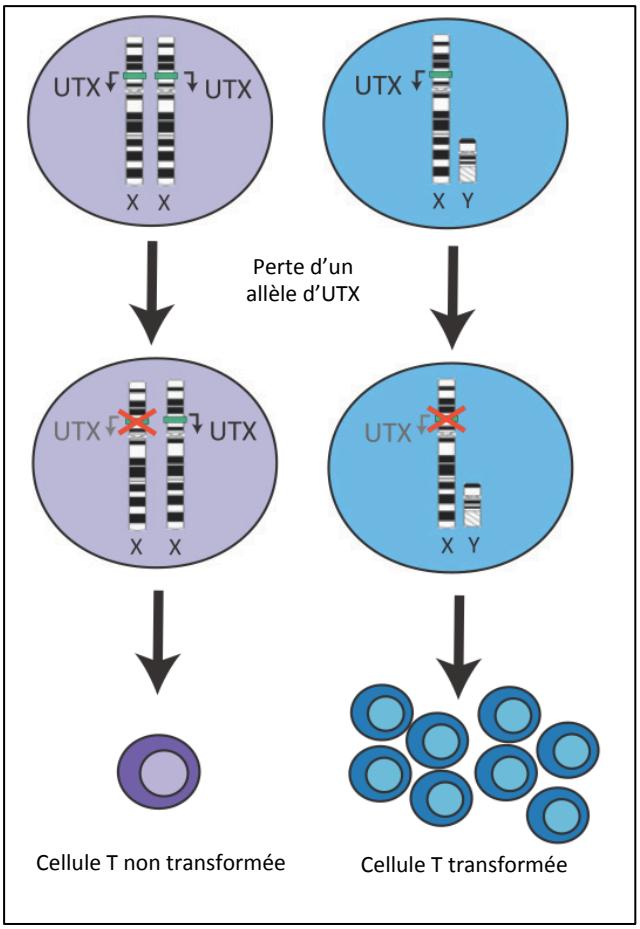


Figure 34. Inactivation d'UTX dans les LAL-T.
Le gène codant la déméthylase UTX est localisé sur le chromosome X. Son expression échappe à l'inactivation du X dans certaines cellules femelles. Un événement mutationnel dans UTX ne semblerait pas suffisant dans les cellules femelles pour induire la leucémogenèse. En revanche, la perte du seul allèle d'UTX dans les cellules-T mâles résulte en une inactivation complète de ce gène suppresseur de tumeur, ce qui favorise la transformation cellulaire. D'après Ariës *et al.* 2015.

Des études *in vitro* et *in vivo* du rôle d'UTX dans les LAL-T montrent que l'inactivation d'*UTX* favorise la leucémogenèse et confirment qu'*UTX* est un gène suppresseur de tumeur (Ntziachristos *et al.* 2014, Van des Meulen *et al.* 2015). Cependant des études supplémentaires sont nécessaires pour comprendre les conséquences exactes de la perte de fonction d'UTX notamment dans les LAL-T où les membres du PRC2 ont également été décrit comme suppresseurs de tumeurs, ce qui semble *à priori* contradictoire. Il serait donc intéressant de comparer les conséquences transcriptionnelles de la mutation d'UTX et d'EZH2 dans un même modèle. Cela permettrait de déterminer si la fonction suppresseur de tumeur est liée à son activité déméthylase d'H3K27 ou résulte de fonctions indépendantes de cette activité.

Bien qu'un rôle oncogénique de JMJD3, l'autre déméthylase d'H3K27, ait été rapporté dans quelques tumeurs, aucune mutation n'a été retrouvée (Ntziachristos *et al.* 2014). Son importance en cancérologie reste à explorer.

IV-4.7. Particularités du PRC2

IV-4.7.a) Spécificité des mutations PRC2 dans chaque type tumoral

Tantôt décrits comme oncogènes, tantôt comme suppresseurs de tumeurs, les gènes du PRC2 ont, selon le contexte cellulaire, un profil de mutations bien différentes.

De plus, même au sein des tumeurs ayant une perte de fonction du PRC2 avec comme conséquence commune la baisse du niveau de triméthylation d'H3K27 et une dé-répression des gènes cibles du PRC2, les gènes altérés peuvent être complétement différents. Ainsi, à ce jour la mutation K27M semble être spécifique des GHG alors qu'aucune altération d'*EZH2*, *SUZ12* ou *EED* n'y est retrouvée… Ces constatations suggèrent que les conséquences de chacune de ces mutations ne sont pas équivalentes, notamment sur les niveaux globaux d'H3K27me2/3. L'étude en détail des différences fonctionnelles de chaque type de mutation est nécessaire pour mieux comprendre, à l'avenir, leurs rôles respectifs (Figure 35).

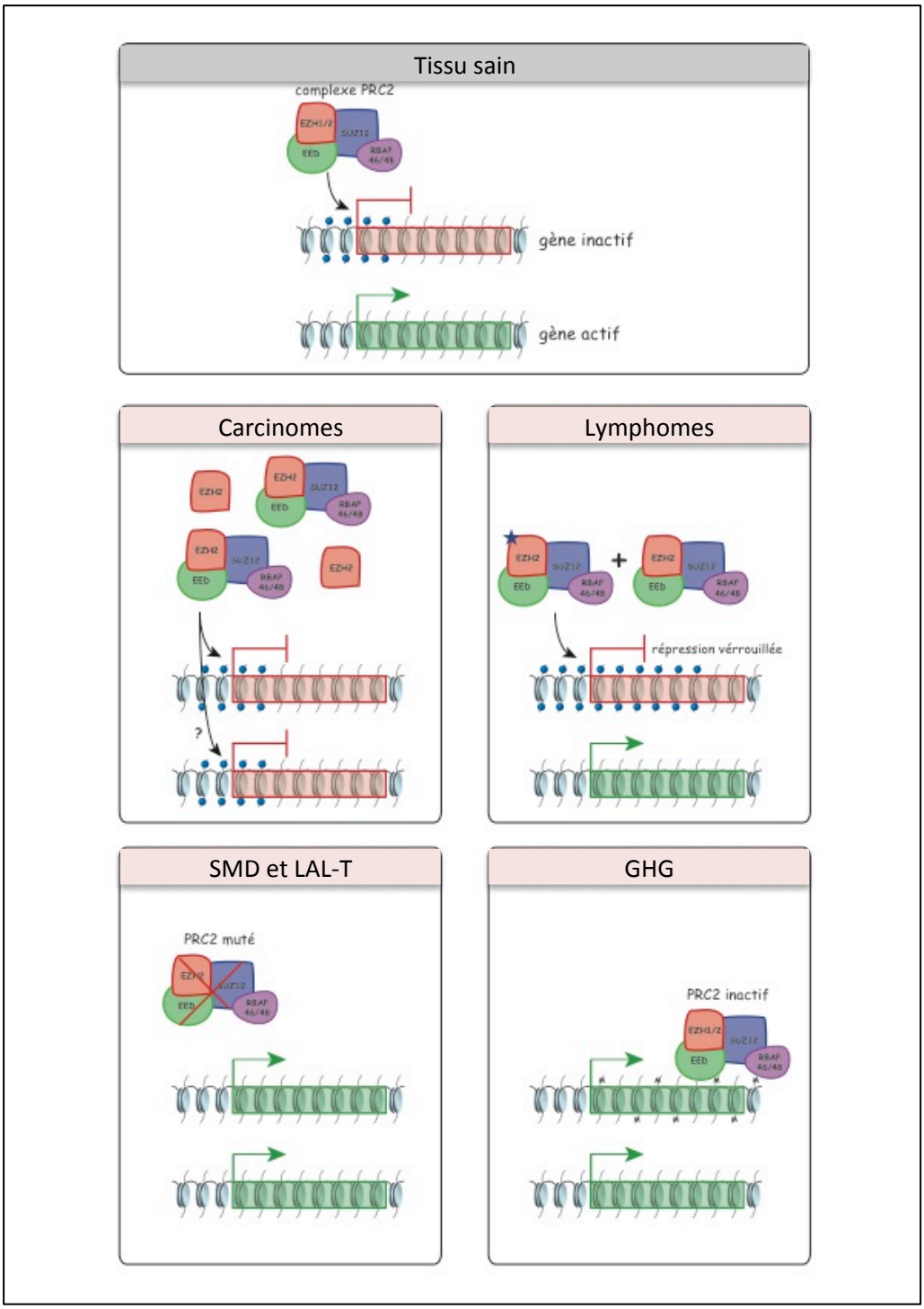


Figure 35. Conséquences connues ou supposées des altérations du PRC2 sur la répression transcriptionnelle.
Les connaissances actuelles sur les altérations du PRC2 dans les cancers illustrent la diversité mais également la spécificité des dérégulations de la machinerie Polycomb.

IV-4.7.b) PRC2, un régulateur transcriptionnel pas comme les autres

Comme nous rapporté plus haut, diverses études menées chez la Drosophile puis chez les mammifères ont montré que le rôle du PRC2 n'est pas d'établir l'état silencieux transcriptonnels des gènes mais plutôt de le maintenir (Strulh *et al.* 1985, Riising *et al.* 2014).

Ainsi, le PRC2 n'est pas un élément conducteur d'une identité cellulaire particulière mais un gardien de cette identité. Ces propriétés particulières compliquent l'analyse de leur contribution à la tumorigenèse. Le recrutement secondaire du PRC2 suite à l'arrêt de la transcription explique qu'une grande majorité des cibles du complexe soit insensible à son altération, au moins à l'échelle d'une population cellulaire. Comment dès lors expliquer l'impact de la perte de fonction du PRC2 sur le développement tumoral ? L'impact de l'altération du PRC2 est-il le résultat direct de l'activation d'une petite cohorte de gènes ou bien de la perte d'une couche de régulation au niveau de plusieurs milliers d'autres gènes ?

La plupart des études actuelles s'intéressent essentiellement à la première composante. Il est proposé que selon le tissu touché, le résultat de l'activation de gènes « prêts à être activés » pourrait *à priori* induire soit 1) un changement de l'état de différenciation, une partie importante des cibles du PRC2 codant des facteurs de spécification de l'identité cellulaire soit 2) une agressivité accrue des cellules cancéreuses (prolifération, migration, etc…) si la balance des gènes pro- et anti-tumorigéniques penche en faveur d'une action pro-tumorigénique. Cependant, la nature des cibles diverge grandement d'un tissu à l'autre et les études diffèrent quant aux cibles candidates si bien qu'à l'heure actuelle aucune preuve définitive ne permet d'établir que la dérégulation d'une cohorte de gènes définis sous-tende l'implication du PRC2 comme régulateur de la tumorigenèse.

On peut en outre imaginer que la perte d'une couche de régulation au niveau de plusieurs milliers de gènes puisse avoir un impact important pour la progression tumorale. Il sera notamment intéressant d'évaluer la réponse de ces gènes « silencieux » à un stimulus ou bien d'évaluer s'ils sont activés de manière stochastique dans une fraction de cellule. Une telle activation sporadique serait susceptible de favoriser l'hétérogénéité cellulaire et donc d'accélérer l'évolution tumorale.

IV-4.8. Létalité synthétique

Il a été décrit que certains types de cellules tumorales pouvaient présenter une sensibilité accrue à des thérapies s'ils présentaient une altération du PRC2. Ainsi, quelques études montrent dans les cancers diverses létalités synthétiques impliquant EZH2 et d'autres acteurs de régulation de la structure de la chromatine. Par exemple, Kim *et al.* ont montré qu'EZH2 était essentiel à la survie de lignées cellulaires cancéreuses et de xénogreffes mutées dans différentes sous-unités du complexe SWI/SNF de remodelage des nucléosomes (comme

ARID1A, *PBRM1* ou *SMARCA4*) (Kim *et al.* 2015). Plus récemment, Biter et al. rapportent, dans les cancers de l'ovaire, une létalité synthétique entre l'inhibition d'EZH2 et une mutation dans *ARID1A*, qui est un membre du complexe SWI/SNF (Bitler *et al.* 2015). Là encore, l'inhibition d'EZH2 cause la régression des tumeurs de l'ovaire mutées *ARID1A* xenogreffées dans des modèles murins. En conséquence, l'inhibition pharmacologique d'EZH2 est proposée comme une nouvelle stratégie thérapeutique dans les cancers mutés *ARID1A* (Figure 36).

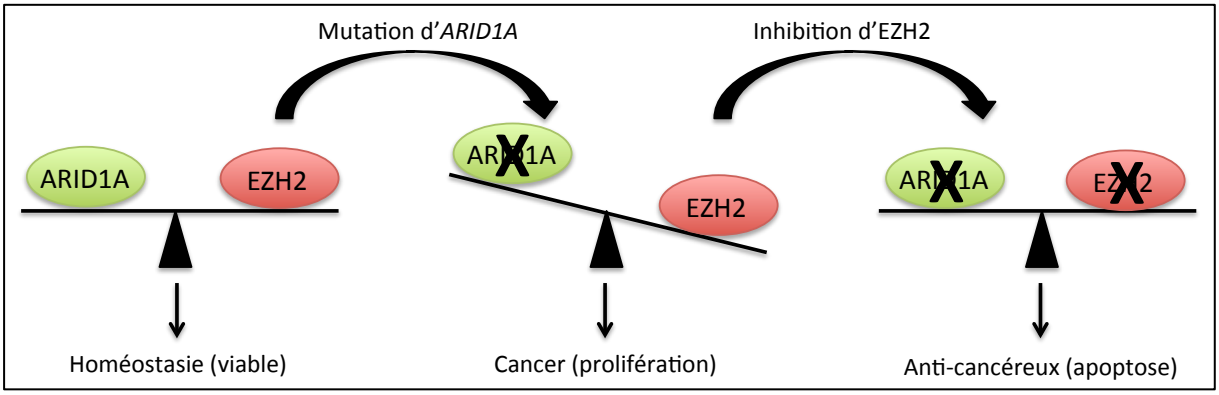


Figure 36. Modèle de létalité synthétique entre la mutation d'*ARID1A* et l'inhibition de l'activité méthyl-transférase d'EZH2 dans les cancers de l'ovaire.
S'il existe un antagonisme fonctionnel d'ARID1A et d'EZH2 dans les cellules de l'ovaire, une mutation perte de fonction d'*ARID1A* induit un déséquilibre en faveur d'EZH2. L'inhibition pharmacologique d'EZH2 est donc proposée comme solution thérapeutique afin de rétablir ce déséquilibre. D'après Bitler *et al.* 2015.

Un autre exemple similaire concerne BAP1 qui appartient au complexe Polycomb PR-DUB (*Polycomb Repressive Deubiquitinase*). Il a été montré que la perte de fonction de BAP1 dans les mésothéliomes sensibilisait ces tumeurs à l'inhibition pharmacologique d'EZH2 (LeFave *et al.* 2015).

IV-5. PRC2 et pathologie du neuro-développement

IV-5.1. Rôle du PRC2 dans le développement neuronal

La répression génique assurée par le PRC2 est importante pour de nombreux processus développementaux dont le développement neuronal. L'étude des expressions de chacun des composants majoritaires du PRC2 au cours de l'embryogenèse montre qu'il joue un rôle crucial dans la mise en place du cerveau et de la moelle épinière (Qi *et al*. 2013). Chez la souris, dans un modèle de KO (*KnockOut*) conditionnel, il a été montré que le PRC2 (et en particulier EZH2) était un acteur majeur de la neurogenèse et le développement du cortex cérébral (Pereira *et al*. 2010). Cette fonction pourrait résulter en partie de l'action du PRC2

sur les gènes de la voie Wnt/béta-caténine qui doivent être réprimés dans les précurseurs neuronaux (Hirabayashi *et al*. 2009). Enfin, une dernière étude a mis en évidence que le PRC2 via EZH2 était un acteur clé de la mise en place et de la plasticité de l'arborisation dendritique (Qi *et al*. 2014).

IV-5.2. Mutations de membres du PRC2 dans un syndrome neuro-développemental: le syndrome de Weaver

IV-5.2.a) La dysmorphie faciale et la croissance excessive des patients Weaver rappellent les symptômes de certains patients NF1

Le syndrome de Weaver (OMIM 277590) est un syndrome très rare de croissance excessive, à transmission autosomique dominante. Outre l'avance staturale, il est caractérisé par une dysmorphie faciale caractéristique (Figure 37). L'avance d'âge osseux est un autre élément clé du diagnostic et responsables d'anomalies ostéo-articulaires à type de déformation des pieds, d'anomalies des vertèbres cervicales et d'élargissement métaphysaire des os longs ont été décrites. Une mauvaise coordination motrice, des camptodactylies, des hernies ombilicales et inguinales et une hyperlaxité avec excès de peau ont aussi été décrits. Les patients présentent un retard de développement léger à modéré mais certains d'entre eux n'ont pas de déficience intellectuelle à l'âge adulte (Tatton-Brown *et al*. 2013).

Il a été décrit que la dysmorphie faciale et la croissance excessive observée chez les patients porteurs de délétions récurrentes du *locus NF1* étaient comparable à celles observées dans le syndrome de Weaver (Van Asperen *et al*. 1998) (Figure 37)

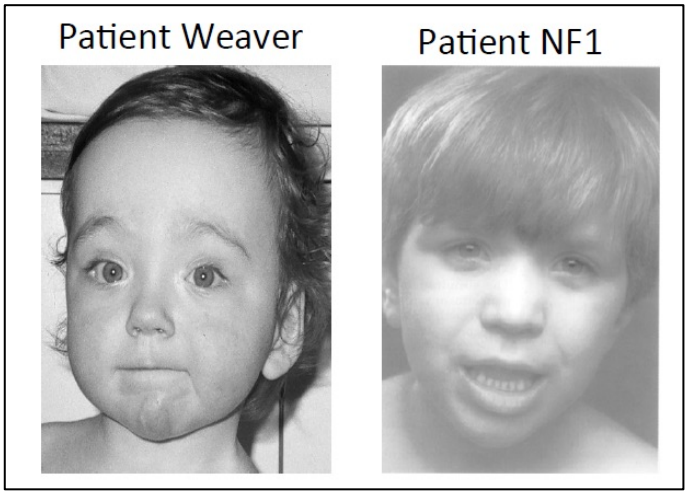


Figure 37. Photos d'un patient atteint du syndrome de Weaver et d'un patient NF1 porteur d'une délétion du *locus* 17q11.2.
La dysmorphie faciale caractéristique d'un patient Weaver inclut une macrocéphalie avec un front large, un occiput plat, un hypertélorisme, un long philtrum, des oreilles larges, une micrognathie et un sillon mentonnier

marqué. Ces caractéristiques faciales sont très proches de celles retrouvées chez les patients NF1 porteurs d'une microdélétion récurrente comprenant *SUZ12* et *RNF135*.

En 2007, le gène *RNF135 (RiNg Finger protein 135*), inclus dans la microdélétion *NF1* récurrente du *locus* 17q11.2, avait été proposé comme gène causal de la croissance excessive des patients porteurs de microdélétions du *locus NF1*. En effet, des mutations de ce gène avaient été identifiées chez six patients NF1 non apparentés porteurs de microdélétion (Douglas *et al*. 2007). Mais toutes ces mutations étaient héritées et depuis cette publication, aucune autre mutation de *RNF135* n'a été décrite chez des patients NF1. Ainsi, nous faisons l'hypothèse que c'est plutôt l'inactivation du PRC2 par haplo-insuffisance du gène *SUZ12* qui pourrait être responsable des anomalies de croissance et de la dysmorphie faciale retrouvées chez les patients porteurs de délétions récurrentes du *locus NF1*.

IV-5.2.b) Mutations constitutionnelles d'EZH2

Des mutations constitutionnelles du gène *EZH2* ont été identifiées par une approche de séquençage d'exomes chez 22 patients non apparentés atteints du syndrome de Weaver (Gibson *et al*. 2012 ; Tatton-Brown *et al*. 2011). La plus grosse cohorte de patients mutés *EZH2* publiée est constituée de 48 patients atteints du syndrome de Weaver (Tatton-Brown *et al.* 2013).

Seulement deux patients, parmi les 48 de la plus grosse cohorte publiée, ont développé des tumeurs. Chez le premier, porteur de la mutation Glu745Lys, un lymphome est apparu à 13 ans. Le deuxième, muté Ala682Thr a développé une leucémie aigue lymphoblastique et un neuroblastome à 13 mois. En dehors de ces deux patients, aucune autre tumeur n'est apparue chez les patients porteurs d'une mutation hétérozygote d'*EZH2* dans toutes les cellules de leur organisme y compris dans les précurseurs de cellules hématopoiëtiques.

Les mutations d'*EZH2* retrouvées chez les patients atteints d'un syndrome de Weaver sont majoritairement des mutations faux-sens. Elles sont distribuées tout le long du gène EZH2 avec une localisation préférentielle au niveau du domaine SET. Les mutations tronquantes sont plutôt rares (4/48) et n'ont été identifiées que dans le dernier exon d'*EZH2* en aval du domaine SET. La répartition des mutations était très chevauchante avec celle de mutations somatiques décrites dans des cancers et en particulier avec celui des hémopathies malignes (Figure 38).

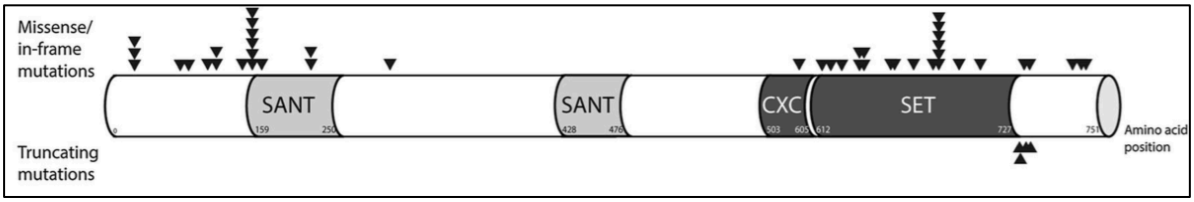


Figure 38. Représentation des localisations des mutations affectant *EZH2* dans le syndrome de Weaver. La plupart des mutations identifiées dans le syndrome de Weaver siègent dans le domaine SET. Issu de Tatton-Brown *et al*. 2013.

Une analyse des conséquences de quelques mutations identifiées chez les patients Weaver a montré que ces mutations altérait l'activité histone méthyltransférase d'EZH2 *in vitro.* Aucune corrélation entre l'activité méthyltransférase *in vitro* et la sévérité du phénotype n'a pu être retrouvé (Cohen *et al.* 2015).

IV-5.2.c) Mutations constitutionnelles d'EED

Très récemment, une équipe rapporte la mise en évidence de la présence de mutations faux-sens constitutionnelles *de novo* d'*EED* chez deux patients présentant un syndrome de Weaver-*like* (Cohen *et al.* 2015 et Cohen *et al.* 2016). Ces mutations concernent des acides aminés très conservés et sont localisées dans un des domaine WD40 d'EED. En outre, l'analyse des variations du nombre de copies génomiques de 15749 patients atteints de déficiences intellectuelles et d'anomalies du développement issu du consortium ISCA (*International Standards for Cytogenomic Arrays*) contre 10118 témoins a mis en évidence deux patients présentant une délétion emportant le gène *EED* (Kaminsky *et al.* 2011).
La recherche plus approfondie de mutations au sein des différents membres du PRC2 semble donc une piste intéressante dans le diagnostic des patients atteints du syndrome de Weaver.

IV-5.2.d) Recouvrement phénotypique avec le syndrome de Sotos

Le diagnostic différentiel du syndrome de Weaver inclut le syndrome de Sotos avec lequel il existe un grand recouvrement phénotypique. Il est intéressant de constater que les patients atteints du syndrome de Sotos présentent également des mutations dans des acteurs de modifications de la chromatine : NSD1 (*Nuclear receptor binding SET Domain protein 1*) (Kurotaki *et al.* 2002), SETD2 (*SET Domain containing 2*) (Luscan *et al.* 2014) et DNMT3A (*DNA (cytosine-5-)-MethylTransferase 3 Alpha*) (Tatton-Brown *et al.* 2014). Au vu de la similarité phénotypique des syndromes Weaver et de Sotos, il serait intéressant de comparer les conséquences transcriptomiques de ces différentes mutations. Cette question se justifie

d'autant plus que la méthylation d'H3K36 (régulée par *NSD1* et *SETD2*) et d'H3K27me3 ont des régulations croisées.

OBJECTIFS de thèse

Comme nous l'avons vu, seuls les neurofibromes plexiformes peuvent se transformer en tumeurs malignes MPNST qui sont des sarcomes extrêmement agressifs résistants aux thérapies actuelles et représentant la première cause de mortalité des patients NF1 (Figure 39).

A ce jour, les acteurs à l'origine de cette transformation maligne ne sont pas clairement établis. Leur identification représente donc un enjeu majeur pour une prise en charge appropriée des patients et le développement de nouvelles molécules thérapeutiques.

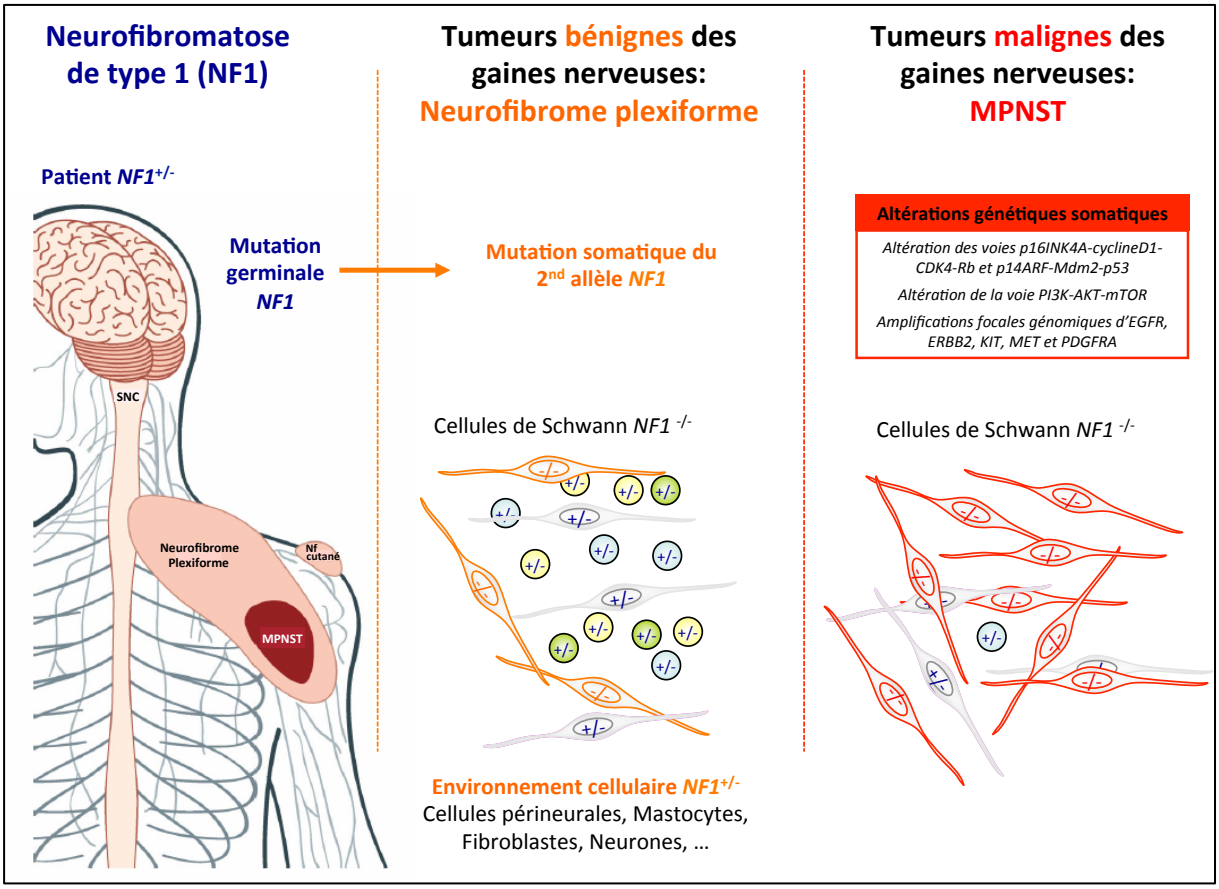


Figure 39. Représentation schématique et évolution des différents types de neurofibromes dans la NF1.
Les patients NF1 présentent dans toutes leurs cellules une mutation constitutionnelle hétérozygote perte de fonction du gène suppresseur de tumeur *NF1*. Une des principales caractéristiques de cette maladie est le développement de tumeurs bénignes des gaines neurveuses périphériques, les neurofibromes. Ces neurofibromes présentent une seconde mutation somatique inactivant la deuxième copie fonctionnelle du gène *NF1* au sein des cellules de Schwann (modèle de Knudson). Le statut haplo-insuffisant *NF1* de l'environnement cellulaire jouerait également un rôle dans le développement tumoral. Seuls les neurofibromes plexiformes peuvent se transformer en MPNST. Quelques gènes ont été montrés comme potentiellement impliqués dans la tumorigenèse des MPNST. Inspiré de *Reilly et al.* 2009.

Dans ce contexte, le travail mené au cours de ma thèse a eu pour objectifs la recherche et la caractérisation de nouvelles voies de signalisations impliquées dans la tumorigenèse NF1.

Deux approches ont été menées parallèlement.

- APPROCHE 1

D'une part, une approche orientée par les travaux antérieurs au laboratoire a consisté en l'exploration de l'implication de la voie WNT dans la tumorigenèse NF1.

- APPROCHE 2

D'autre part, un risque accru de développer des MPNST existe chez les patients porteurs de délétions récurrentes du *locus NF1*, faisant supposer l'existence d'un gène suppresseur de tumeur additionnel appartenant à l'intervalle délété (de Raedt *et al.* 2006 ; Pasmant *et al.* 2010) (Figure 40). Parmi les 14 gènes co-délétés avec *NF1*, plusieurs arguments faisaient du membre du PRC2, *SUZ12,* un excellent gène candidat. J'ai donc cherché si la perte de *SUZ12* pouvait être responsable du risque accru de survenu des MPNST chez les patients NF1 délétés et, plus généralement, si l'inactivation du PRC2 jouait un rôle dans la tumorigenèse NF1.

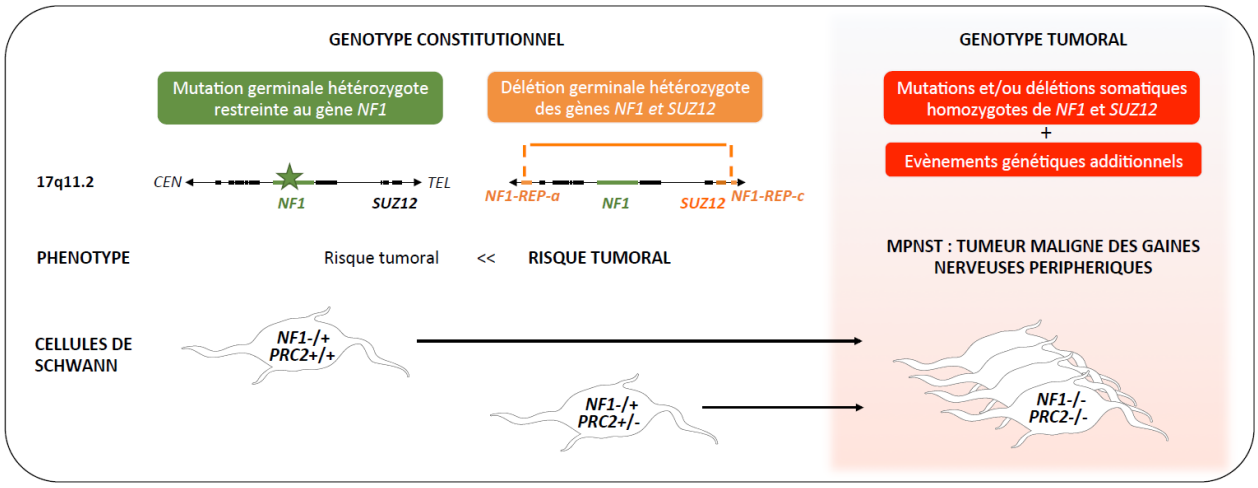


Figure 40. Représentation schématique de l'hypothèse de travail de l'approche 2.
Des altérations génétiques de *NF1* et du PRC2 sont-elles impliquées dans la tumorigenèse des MPNST ? Luscan *et al.* 2014 (Annexe 2).

RESULTATS

I- APPROCHE 1.

Mise en évidence de l'activation de la voie de signalisation WNT au cours de la tumorigenèse NF1.

Article 1:

Luscan A, Shackleford G, Masliah-Planchon J, Laurendeau I, Ortonne N, Varin J, Lallemand F, Leroy K, Dumaine V, Hivelin M, Borderie D, De Raedt T, Valeyrie-Allanore L, Larousserie F, Terris B, Lantieri L, Vidaud M, Vidaud D, Wolkenstein P, Parfait B, Bièche I, Massaad C, Pasmant E. The activation of the WNT signaling pathway is a Hallmark in neurofibromatosis type 1 tumorigenesis. *Clin Cancer Res.* 2014;20(2):358-71.

I-1. Objectif de l'étude

Etudier l'implication de la voie WNT, jamais investiguée jusqu'àlors, au cours de la tumorigenèse NF1.

I-2. Design de l'expérience

J'ai constitué une première série de 22 tumeurs de patients NF1 (sept neurofibromes cutanés, sept neurofibromes plexiformes et huit MPNST) dans lesquelles j'ai quantifié l'ARNm de 89 gènes codant des acteurs de la voie WNT. L'ARNm des 32 gènes différentiellement exprimés entre les différents types de tumeurs a ensuite été quantifié dans une série de validation plus grande, constituée de 57 tumeurs (10 neurofibromes cutanés, 31 neurofibromes plexiformes et 16 MPNST). Dans ce set de validation, l'expression de deux gènes marqueurs de cellules souches et cinq gènes marqueurs d'EMT a été exploré. L'expression des gènes significativement dérégulés a ensuite été étudiée dans des cellules de Schwann humaines, des fibroblastes, des cellules endothéliales, des mastocytes et dans sept lignées de MPNST.

I-3. Résultats

L'expression de neuf gènes WNT était significativement dérégulée dans les neurofibromes plexiformes par rapport aux neurofibromes cutanés. Vingt gènes WNT montraient également une expression altérée dans les biopsies de MPNST et les lignées cellulaires de MPNST. Le marquage de la β-caténine par immunohistochimie des tumeurs confirmait l'activation de la voie WNT/β-caténine dans les MPNST. Grâce à des tests fonctionnels, il a ensuite été

confirmé que l'inactivation du gène *Nf1* par siRNA dans des cellules de Schwann provoquait l'activation de la voie WNT et l'augmentation de β-caténine active, ce qui n'était pas le cas dans les cellules épithéliales. L'activation de la voie WNT était associée à la fois au maintient du réservoir de CSC et à la transition Schwanno-mésenchymale.

Clinical Cancer Research

Human Cancer Biology

The Activation of the WNT Signaling Pathway Is a Hallmark in Neurofibromatosis Type 1 Tumorigenesis

Armelle Luscan[1,4], Ghjuvan'Ghjacumu Shackleford[5], Julien Masliah-Planchon[1], Ingrid Laurendeau[1], Nicolas Ortonne[10], Jennifer Varin[1], François Lallemand[14], Karen Leroy[11], Valérie Dumaine[6], Mikael Hivelin[2,12], Didier Borderie[7], Thomas De Raedt[15], Laurence Valeyrie-Allanore[13], Frédérique Larousserie[8], Benoît Terris[3,9], Laurent Lantieri[2], Michel Vidaud[1,4], Dominique Vidaud[1,4], Pierre Wolkenstein[13], Béatrice Parfait[1,4], Ivan Bièche[1,14], Charbel Massaad[5], and Eric Pasmant[1,4]

Abstract

Purpose: The hallmark of neurofibromatosis type 1 (NF1) is the onset of dermal or plexiform neurofibromas, mainly composed of Schwann cells. Plexiform neurofibromas can transform into malignant peripheral nerve sheath tumors (MPNST) that are resistant to therapies.

Experimental Design: The aim of this study was to identify an additional pathway in the NF1 tumorigenesis. We focused our work on Wnt signaling that is highly implicated in cancer, mainly in regulating the proliferation of cancer stem cells. We quantified mRNAs of 89 Wnt pathway genes in 57 NF1-associated tumors including dermal and plexiform neurofibromas and MPNSTs. Expression of two major stem cell marker genes and five major epithelial–mesenchymal transition marker genes was also assessed. The expression of significantly deregulated Wnt genes was then studied in normal human Schwann cells, fibroblasts, endothelial cells, and mast cells and in seven MPNST cell lines.

Results: The expression of nine Wnt genes was significantly deregulated in plexiform neurofibromas in comparison with dermal neurofibromas. Twenty Wnt genes showed altered expression in MPNST biopsies and cell lines. Immunohistochemical studies confirmed the Wnt pathway activation in NF1-associated MPNSTs. We then confirmed that the knockdown of *NF1* in Schwann cells but not in epithelial cells provoked the activation of Wnt pathway by functional transfection assays. Furthermore, we showed that the protein expression of active β-catenin was increased in *NF1*-silenced cell lines. Wnt pathway activation was strongly associated to both cancer stem cell reservoir and Schwann–mesenchymal transition.

Conclusion: We highlighted the implication of Wnt pathway in NF1-associated tumorigenesis. *Clin Cancer Res; 20(2); 358–71. ©2013 AACR.*

Introduction

Neurofibromatosis type 1 (NF1) is an autosomal dominant neurocutaneous disorder affecting 1 in 3,000 individuals worldwide (1). The *NF1* gene is located in the chromosome region 17q11.2. Its protein product, neurofibromin, functions as a negative regulator of RAS proteins. The main clinical features of NF1 are *café-au-lait* macules, skinfold freckling, iris Lisch nodules, as well as skeletal and cardiovascular abnormalities. NF1 patients have an increased risk of both benign and malignant tumors, therefore, NF1 is classified as a tumor predisposition syndrome. The most common tumors are benign peripheral nerve

Authors' Affiliations: [1]UMR_S745 INSERM, Université Paris Descartes Sorbonne Paris Cité, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques; [2]Department of Plastic and Reconstructive Surgery, Hôpital Européen Georges Pompidou, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), PRES Sorbonne Paris Cité; [3]Service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Hôpital Cochin, Université Paris Descartes; [4]Service de Biochimie et de Génétique Moléculaire, Hôpital Cochin, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP); [5]UMR8194 CNRS, PRES Sorbonne Paris Cité, Paris Descartes; [6]Department of Orthopedic Surgery, Cochin Hospital; [7]Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Faculté de Médecine, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Hôpital Cochin, Laboratory of Biochemistry; [8]Tumour bank, Cochin Hospital, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Paris Descartes University; [9]INSERM, U1016, Institut Cochin, and CNRS, UMR8104, Paris; [10]Département de pathologie Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP) and Université Paris Est Créteil (UPEC); [11]Platform of Biological Ressources; [12]Department of Plastic and Reconstructive Surgery, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP) and Université Paris Est Créteil (UPEC), Hôpital Henri-Mondor; [13]Department of Dermatology, Hôpital Henri-Mondor, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP) and EA 4393 LIC, UPEC, Créteil, France; [14]Laboratoire d'Oncogénétique, Institut Curie, Hôpital René Huguenin; FNCLCC, Saint-Cloud; and [15]Genetics Division, Department of Medicine, Brigham and Women's Hospital, and Harvard Medical School, Boston, Massachusetts

Note: Supplementary data for this article are available at Clinical Cancer Research Online (http://clincancerres.aacrjournals.org/).

Corresponding Author: Eric Pasmant, UMR_S745 INSERM, Université Paris Descartes Sorbonne Paris Cité, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, 4 avenue de l'Observatoire, 75006 Paris, France. Phone: 33-1-53-73-97-25; Fax: 33-1-44-07-17-54; E-mail: eric.pasmant@parisdescartes.fr

doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-0780

©2013 American Association for Cancer Research.

Armelle LUSCAN - Thèse de doctorat - 2016

Translational Relevance

The commonest neurofibromatosis type 1 (NF1)-associated tumors are nerve sheath tumors (NSTs: dermal or plexiform neurofibromas), mainly composed of Schwann cells. Plexiform neurofibromas can undergo malignant transformation to malignant peripheral nerve sheath tumors with a poor vital prognosis. Little is known of the genetic events required for neurofibromas formation or transformation. Here, we found that the Wnt pathway was significantly activated by quantifying mRNAs of 89 Wnt pathway genes in 57 NF1-associated NSTs. We then confirmed that the knockdown of *NF1* in Schwann cells provoked the activation of Wnt pathway by functional transfection assays. We showed that active β-catenin protein expression was increased in *NF1*-silenced cell lines. Wnt pathway activation was strongly associated to both putative cancer stem cell reservoir and Schwann–mesenchymal transition. We highlighted the implication of Wnt pathway in NF1 peripheral nerve sheath tumorigenesis. Elucidation of the role of cellular signaling pathways tumorigenesis will enable to establish molecular targeted therapeutics in NF1.

sheath tumors (neurofibromas), which vary greatly in both number and size, and may be dermal or plexiform (2).

Dermal neurofibromas are typically small and grow as discrete lesions in the dermis whereas plexiform neurofibromas can develop internally along the plexus of major peripheral nerves and become quite large. Plexiform neurofibromas are probably derived from embryonic Schwann cell lineage (3). During development, neural-crest cells migrate along the peripheral nerves, and a subset of cells commit to the Schwann cell lineage. Zheng and colleagues demonstrated that plexiform neurofibromas could originate from *Nf1* deficiency in fetal nonmyelinating Schwann cells (4). Le and colleagues identified a population of progenitor cells residing in the dermis, termed "skin-derived precursors" that form dermal neurofibromas through loss of *Nf1* (5). These differences between dermal and plexiform neurofibromas suggest that the type of progenitor but also the timing of somatic *NF1* mutations may determine the clinical course of these tumors (6).

In contrast to dermal neurofibromas, plexiform neurofibromas can undergo malignant transformation to malignant peripheral nerve sheath tumors (MPNST) in about 10% of NF1 patients (7). Roughly half of all MPNSTs are sporadic; they are found in patients who do not carry any known genetic predisposition for cancer. The remaining MPNSTs are found in patients who are diagnosed with NF1. MPNSTs are resistant to conventional therapies, and their deep-seated position and locally invasive growth hinder complete surgical resection. The 5-year survival rate among patients with MPNSTs ranges from 30% to 50%. In parallel to the double inactivation of the *NF1* gene, additional genetic lesions seem necessary for malignant progression of plexiform neurofibromas. *TP53* mutations have been identified in MPNSTs but not in benign neurofibromas, indicating that the p53-mediated pathway is involved in malignant progression (6, 8). Alterations of other genes (*p16/CDKN2A*, *p14/ARF*, *p27/KIP1*, *EGFR*, *mTOR*) were also detected in MPNST (9–12).

Although we have now identified some of the genes that when mutated initiate tumor formation and drive progression, the identity of the cell population(s) susceptible to such transforming events remains undefined in the majority of human cancers. Recent studies indicate that a small population of cells (called cancer stem cells) endowed with unique self-renewal properties and tumorigenic potential is present in some, and perhaps, all tumors (13, 14). Many signaling pathways involved in the maintenance of normal stem cells are found to be altered in several human cancers (i.e., Wnt, Hedgehog, and Notch pathways). Moreover, several authors addressed the possible association between the formation of stem cells and the epithelial–mesenchymal transition (EMT). Regulation of the EMT is a crucial step in cancer development (15). Genetic alterations that impair the differentiation program could endow such dedifferentiated cells with attributes that mimic stem cell behavior.

In NF1 tumorigenesis, the question whether these tumors arise from neural crest stem cells or differentiates glia remains very controversial (4, 5, 16, 17). In this regard, we have previously shown a dedifferentiation of Schwann cells, as well as an activation of the Hedgehog signaling pathway, during malignant transformation of plexiform neurofibromas (18). *TWIST1*, an important transcription factor involved in embryonic development and in EMT, was shown to be upregulated in NF1-associated MPNST (19). Taken together, these findings suggest a genetic-driven Schwann–mesenchyme transition (SMT) that could generate cancer stem cells during NF1 tumorigenesis.

Wnt pathway is a major developmental pathway involved in maintenance of normal stem cells (20), and altered in several human cancers (21). Wnt signaling is a complex process that requires interplay of many different proteins. In addition to a large cohort of Wnt ligands, and frizzled receptors, some Wnt pathways also require the presence of coreceptors. Wnt ligands may activate 3 different pathways (Supplementary Fig. S1): (i) the canonical pathway: involving β-catenin and LEF/TCF transcription factor; (ii) the planar cell polarity pathway; and (iii) the Wnt/calcium pathway (20, 22). All 3 pathways have different consequences and drive specific processes for the cells in which they signal.

Little is known of the additional cooperating genetic events potentially required for full plexiform neurofibroma formation. Furthermore, the respective tumorigenic mechanisms of dermal neurofibromas and plexiform neurofibromas have rarely been compared (6). In this manuscript we addressed the potential role of Wnt signaling in NF1 tumorigenesis. We here quantified the gene expression profiles of 89 actors of Wnt pathway in NF1-associated tumors. We identified specific genes involved in Wnt signaling pathway whose expressions significantly differed between

3 NF1-associated tumor types: dermal and plexiform neurofibromas and MPNSTs. We functionally confirmed the crosslink between *NF1* alteration and Wnt pathway activation, using siRNA strategy in a cell line model. Finally, we investigated the link between Wnt signaling pathway activation and the altered expression of stemness and SMT genes.

Materials and Methods

Patients and samples

NF1-related samples were obtained by laser excision (dermal neurofibromas) or surgical excision (plexiform neurofibromas and MPNSTs) from patients with NF1 at Henri Mondor Hospital (Creteil, France). Sample handling and processing was identical for all NF1-related tumors. After clinical examination, the surgical removal of dermal neurofibromas was proposed in case of esthetical burden. Resection or removal of plexiform neurofibromas was proposed for repair or in case of symptoms, pain or compression. The plexiform neurofibromas (deep lesions involving a plexus of nerves) were large, had a nodular aspect, and severely deformed the affected tissues. They were all S100-positive by immunostaining. Four patients with plexiform neurofibromas had developed MPNSTs. The main clinical and histological characteristics of the 16 patients with MPNSTs (validation set) are shown in Supplementary Table S1. Immediately after surgery the tumor samples were flash frozen in liquid nitrogen and stored at −80°C until RNA extraction. NF1-related MPNSTs all arose from plexiform neurofibromas and showed very weak S100 immunostaining (data not shown). MPNST samples from non-NF1 patients were obtained by surgical excision at Cochin Hospital (Paris, France). Dermal neurofibromas were used as "normal" control samples as they never undergo malignant transformation in MPNSTs. Indeed, neurofibromas are heterogeneous benign tumors composed of Schwann cells, fibroblasts, mast cells, and other cells, and have no "normal" tissue equivalent. Gene expression levels determined by real time reverse transcription (RT)-PCR analysis in plexiform neurofibromas and MPNSTs were thus expressed relative to expression levels in dermal neurofibromas.

Cell lines

We analyzed 7 human MPNST cell lines, namely NMS-2, NMS-2PC, 88-3, ST88-14, 90-8, S462, and T265. NMS-2 and NMS-2PC were kind gifts from Dr. Akira Ogose (Niigata University School of Medicine, Niigata, Japan). 88-3, ST88-14, and 90-8 were kind gifts from Dr. Nancy Ratner (Cincinnati Children's Hospital Medical Center, Cincinnati, OH). S462 was a kind gift from Dr. Lan Kluwe (University Hospital Eppendorf, Hamburg, Germany). T265 was a kind gift from Dr. G De Vries (Loyola University, Chicago, IL). MPNST cell lines were grown in RPMI medium supplemented with 10% heat-inactivated FBS, 10 IU/mL penicillin, and 10 μg/mL streptomycin. Normal Schwann cells and fibroblasts were obtained by primary cell culture and differential isolation from normal sciatic nerve biopsies and skin, respectively, and using cell culture and isolation conditions as previously described (23–25). Normal mast cells were obtained by means of cell culture and various specific purification steps from cord blood-derived human cells, as previously described (26).

We functionally analyzed the crosslink between *NF1* alteration and the Wnt pathway using siRNA strategy in the mouse Schwann cell line MSC80. MSC80 cells exhibit normal Schwann cell characteristics (S100, myelin protein zero, peripheral myelin protein 22 expression) and have retained the capacity to myelinate axons (27). The mouse Schwann cell line MSC80 was maintained in Dulbecco's minimal essential medium (DMEM) supplemented with 10% decomplemented fetal calf serum (Hyclone-Perbio), 1% penicillin, 1% streptomycin (Gibco), and 1% glutamine. Culture cells were grown at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO_2. A siRNA strategy was also used in 2 human non-Schwann cell lines: the breast cancer cell line, namely MCF-7 (Michigan Cancer Foundation-7), and one embryonic kidney cell line, namely HEK293 (Dr. François Lallemand, Institut Curie, Saint-Cloud, France). We also analyzed mouse embryonic fibroblasts (MEF) derived from wild-type mice and from $Nf1^{-/-}$ mice (Dr. Thomas De Readt, Harvard Medical School, Boston, MA).

Human mRNAs quantification by real-time RT-PCR: studied panels

We first quantified the mRNA expression level of the 89 Wnt pathway human genes in a series of 7 dermal neurofibromas, 7 plexiform neurofibromas, and 8 MPNSTs (screening set; $N = 22$ tumors). The 89 Wnt pathway quantified genes encode 19 Wnt ligands, 13 Wnt receptors, 32 proteins involved in canonical Wnt signal transduction, 4 Wnt transcription factors, 10 LEF/TCF–inducible proteins (http://www.stanford.edu/~rnusse/pathways/targets.html), and 11 proteins involved in noncanonical Wnt signal pathways including 4 proteins involved in the planar cell polarity pathway and 7 proteins in the Wnt/calcium pathway (Supplementary Table S2). The mRNA expression of the 32 markedly differentially expressed genes was then determined in a larger tumor series including 10 dermal neurofibromas, 31 plexiform neurofibromas, and 16 MPNSTs (validation set: 57 tumors). Expression of 2 major stem cell marker genes (*PROM1* and *NKX2.2*) and 5 major EMT marker genes (*TWIST1*, *SLUG*, *VIM*, *SNAIL*, and *CDH1*) was also assessed in the validation set ($N = 57$ tumors).

We then selected for further study the 24 genes whose expression in the MPNST group and/or in the plexiform neurofibroma group markedly differenced (>2-fold) from that in the dermal neurofibroma group. Expression of the 24 genes was studied in normal human Schwann cells, fibroblasts, endothelial cells, and mast cells, in 7 NF1-related MPNST cell lines, in 4 sporadic MPNSTs, and in $Nf1^{+/+}$ and $Nf1^{-/-}$ MEFs. Expression of the 24 genes was also studied in the 2 human non-Schwann cell lines (HEK293 and MCF-7) and one mouse Schwann cell line (MSC80) with siRNAs-mediated *NF1* knockdown.

Armelle LUSCAN - Thèse de doctorat - 2016

mRNAs quantification by real-time RT-PCR: method

We first used real-time quantitative RT-PCR to quantify the mRNA expression of 89 selected Wnt pathway associated-genes in a series of MPNSTs and plexiform neurofibromas, by comparison with dermal neurofibromas. Quantitative RT-PCR is a major alternative to microarrays for molecular tumor profiling, being far more precise, reproducible, and quantitative (28). Furthermore, it is more appropriate for analyzing weakly expressed genes such as the Wnt genes in this study. Finally, RT-PCR requires smaller amounts of total RNA (about 2 ng per target gene), which is more adapted for analyzing small-sized tumors.

The theoretical and practical aspects of real-time quantitative RT-PCR using the ABI Prism 7900 Sequence Detection System (Perkin-Elmer Applied Biosystems) have been described in detail elsewhere (28). We quantified transcripts of 2 endogenous RNA control genes involved in 2 cellular metabolic pathways, namely *TBP*, which encodes the TATA box-binding protein (a component of the DNA-binding protein complex TFIID) and *RPLP0* (also known as *36B4*), which encodes acidic ribosomal phosphoprotein P0. *TBP* and *RPLP0* were selected as endogenous controls because the levels of their transcripts in the tumor samples were low (Ct values between 24 and 26) and high (Ct values between 18 and 20), respectively. Each sample was normalized on the basis of its *TBP* (or *RPLPO*) content. Results, expressed as *N*-fold differences in target gene expression relative to the *TBP* (or *RPLPO*) gene, and termed "N*target*," were determined as $N\mathit{target} = 2^{\Delta Ct_{sample}}$, where the ΔCt value of the sample was determined by subtracting the average Ct value of the target gene from the average Ct value of the *TBP* (or *RPLP0*) gene (29). The N*target* values of the tumor samples were subsequently normalized such that the mean of the dermal neurofibroma N*target* values was 1. Primers for *TBP*, *RPLP0*, and the target genes were chosen with the assistance of the computer programs Oligo 6.0 (National Biosciences). For each primer pair, we performed no-template control (NTC) and no-reverse-transcriptase control (RT-negative) assays, which produced negligible signals (usually >40 in Ct values), suggesting that primer–dimer formation and genomic DNA contamination effects were negligible. RNA extraction, cDNA synthesis, and PCR reaction conditions have been described elsewhere (29).

Immunohistochemical study

Formalin fixed, paraffin embedded skin samples were retrieved from the archive material of the department of Pathology of Henri Mondor Hospital. Hematoxylin–eosin–saffron (HES) staining and immunohistochemistry were applied to 3-μm-thick dewaxed sections. Immunostaining of β-catenin (BD Biosciences Pharmingen) was done using the Bond max device (Menarini diagnostics, France), at a 1:4,000 dilution after antigen retrieval by heat at pH 9. In all samples, we checked the staining of epithelial (epidermis or adnexae) and/or endothelial cells as internal positive controls.

HEK293, MCF-7, and MSC80 cells transfection with siRNA

To knockdown the *NF1* gene, human cell lines (HEK293 and MCF-7) and mouse cells (MSC80) transient transfections were carried out using Effecten reagent (Qiagen) for MSC80, and Hiperfect Transfection Reagent (Qiagen) according to HiPerFect Transfection Reagent Handbook for human cell lines. SiRNAs were purchased from Qiagen: mouse siRNA against *Nf1* (reference GS18015), human siRNA against *NF1* (reference GS4763), and nontargeted (NT) siRNAs (negative control reference 1027310). Mouse *Nf1* and human *NF1* genes were targeted with 4 different sequences of siRNA directed against 4 different regions of the cognate mRNA. We quantified gene expressions at both mRNA (using real-time RT-PCR) and protein (using Western blot) levels to assess the siRNAs efficacy.

Luciferase reporter assay of β-catenin–mediated Wnt signaling pathway activation

Luciferase reporter assay was used to determine the Wnt pathway signaling activity in *Nf1* invalidated or in control (nontargeting; NT) siRNAs MSC80 cells. SuperTOP-Flash-Luc plasmids were kindly provided by Dr. R T Moon (University of Washington School of Medicine, Seattle, WA). One day before transfection, MSC80 cells (1.5×10^5 cells per well) were seeded into 6-well plate and incubated in the DMEM culture medium containing 10% decomplemented fetal calf serum. SuperTOP-Flash-Luc plasmid (0.4 μg), the pCMV-β-galactosidase expression vector (0.1 μg), and siRNAs (25 nmol/L) were mixed with a solution containing Effecten reagents (0.85 mg/mL) in DMEM. The mixture was then added to the cells and incubated overnight. Sixteen hours after transfection, the medium was replaced by DMEM culture medium containing 10% decomplemented fetal calf serum. Luciferase activity was determined using an enzymatic method described by Massaad and colleagues (30). The β-galactosidase activity was used for the transfection efficiency normalization.

Protein extraction and Western blot analysis

Cells transfected with NT siRNA or with siRNAs against *NF1* were homogenized in 100 μL ice-cold RIPA buffer [50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 150 mmol/L NaCl, 0.1% SDS, 0.5% sodium deoxycholate, 1% NP-40, 5 mmol/L EDTA, pH 8.0, 2 mmol/L phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF; Sigma-Aldrich), 50 μg/mL leupeptin, 50 μg/mL pepstatin A, and 50 μg/mL aprotinin]. Protein concentration of the clarified homogenates (4°C, 15 minutes, 13,500 rev/min) was determined on all samples using the Bradford protein assay (Bio-Rad Laboratories). Aliquots of 30 μg of total protein extracts were used for each sample. Homogenate proteins were separated on 15% SDS-PAGE gel or on Precast XT 4% to 12% Bis-Tris Criterion Gel (Bio-Rad) for neurofibromin and blotted onto polyvinylidene difluoride membranes. Nonspecific binding sites in the transblots were blocked at 4°C overnight with 5% bovine serum albumin (BSA), 0.01% Tween 20 (Invitrogen), TBS, pH 7.4. Membranes were then incubated at room temperature

for 2 hours with the following primary antibodies diluted in a mixture of 5% BSA blocking agent and TBS-Tween 0.1%: active (dephospho) β-catenin (anti-ABC) clone 8E7 antibody (1:1,000), β-catenin antibody (1:1,000), neurofibromin antibody (1:1,000), and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) antibody (1:10,000). They were then incubated at room temperature for 1 hour 30 minutes with the appropriate secondary antibody diluted in 5% BSA blocking buffer/TBS-Tween 0.1% (anti-mouse and anti-rabbit at 1:20,000), followed by ECL Plus Western blotting detection (Amersham) before exposure to radiographic film Hyperfilm ECL (Amersham). Western blots were quantified by means of NIH Image J Software.

Primary antibodies against neurofibromin (rabbit monoclonal antibody) were purchased from Santa-Cruz (reference sc67), mouse total β-catenin (mouse monoclonal antibody) was purchased from BD Biosciences, human total β-catenin (rabbit polyclonal antibody) was purchased from Cell Signaling (reference #9562), active-β-catenin (mouse monoclonal antibody) and GAPDH (mouse monoclonal antibody) were purchased from Millipore (reference 05-665 and G8795). Secondary antibodies used for Western blotting were horseradish peroxidase–conjugated goat anti-mouse and anti-rabbit immunoglobulin G (Millipore).

Statistical analysis

As mRNA levels did not fit a Gaussian distribution, (i) mRNA levels in each subgroup of samples were expressed as their median values and ranges, rather than their mean values and coefficients of variation; and (ii) comparison and relationships between mRNA levels of the different target genes were respectively estimated using nonparametric tests: the Mann–Whitney *U* test (link between 1 qualitative parameter and 1 quantitative parameter) and the Spearman correlation test (link between 2 quantitative parameters). Differences between the 2 populations were judged significant at confidence levels greater than 95% ($P < 0.05$). In the SuperTOP-Flash Luciferase reporter assay, 2 groups comparisons were performed by the Student *T* test. A *P*-value of <0.05 was considered to be statistically significant.

Results

mRNA expression of 89 Wnt pathway genes in 7 dermal neurofibromas, 7 plexiform neurofibromas, and 8 MPNST NF1-related samples (screening set)

Eight (9%) of the 89 genes (i.e., *WNT1*, *WNT7A*, *WNT8A*, *WNT8B*, *WNT9B*, *DKK4*, *KREMEN2*, and *TLE1*) showed very low levels of target gene in dermal neurofibromas, plexiform neurofibromas, and MPNSTs. Their mRNA levels were only detectable but not reliably quantifiable by means of real-time quantitative RT-PCR assays, mainly based on fluorescence SYBR Green methodology (Ct > 32). Thirty-two (39.5%) of the 81 remaining genes were expressed at a different level (>2-fold) in the MPNST group and/or the plexiform neurofibromas group compared with the dermal neurofibromas group: 9 genes were deregulated in the 7 plexiform neurofibromas as compared with the 7 dermal neurofibromas and 30 genes in the 8 MPNSTs as compared with the 7 dermal neurofibromas (Supplementary Table S3).

mRNA expression of 32 identified Wnt pathway genes in 10 dermal neurofibromas, 31 plexiform neurofibromas, and 16 MPNST NF1-related samples (validation set)

Expression levels of the 32 deregulated genes identified by "screening set" analysis were then determined in 10 dermal neurofibromas, 31 plexiform neurofibromas, and 16 MPNST samples. Nine (28.1%) of the 32 genes were significantly deregulated in the 31 plexiform neurofibromas as compared with the 10 dermal neurofibromas ($P < 0.05$; Fig. 1 and Supplementary Table S4): 8 genes were upregulated (*WNT9A*, *FZD1*, *SFRP4*, *SFRP5*, *TLE2*, *MYC*, *CAMK2B*, and *PRKCQ*) and 1 was downregulated (*SFRP1*) in plexiform neurofibromas. These 9 deregulated genes in plexiform neurofibromas encode 1 Wnt ligand (WNT9A), 1 Wnt receptor (FZD1), 4 proteins involved in canonical Wnt signal transduction (SFRP1, SFRP4, SFRP5, and TLE2), 1 LEF/TCF-inducible protein (MYC), and 2 proteins involved in the Wnt/calcium pathway (CAMK2B and PRKCQ).

Twenty (62.5%) of the 32 genes were significantly deregulated in the 16 MPNSTs as compared with the 10 dermal neurofibromas ($P < 0.05$; Fig. 1; Supplementary Table S4): 14 genes were upregulated (*WT5A*, *FZD1*, *FZD8*, *DKK1*, *WIF1*, *LEF1*, *ID2*, *MSX2*, *SOX9*, *WISP1*, *TWIST1*, *BMP2*, *CAMK2B*, and *PRKCQ*) and 6 were downregulated (*WNT2*, *WNT9A*, *DKK3*, *KREMEN1*, *SFRP1*, and *TCF7*) in MPNSTs.

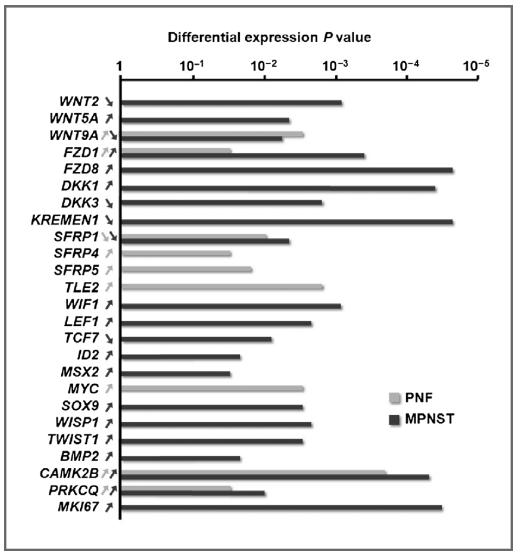


Figure 1. Diagram depicting *P* values (horizontal bars) for significant gene expression differences between MPNSTs and/or plexiform neurofibromas (PNF) and dermal neurofibromas. Arrows indicate increased (up arrow) or decreased (down arrow) differential expression.

These 20 deregulated genes in MPNSTs encode 3 Wnt ligands (WNT2, WNT5A, and WNT9A), 2 Wnt receptors (FZD1 and FZD8), 5 proteins involved in canonical Wnt signal transduction (DKK1, DKK3, KREMEN1, SFRP1, and WIF1), 2 transcription factors (LEF1 and TCF7), 6 LEF/TCF-inducible proteins (ID2, MSX2, SOX9, WISP1, TWIST1, and BMP2), and 2 proteins involved in the Wnt/calcium pathway (CAMK2B and PRKCQ).

Taken together, our results showed that 4 genes were specifically deregulated in plexiform neurofibromas, 15 were specifically dysregulated in MPNSTs, and 6 were dysregulated in both tumor types.

In the same set of 57 samples, we also examined the expression of the *NF1* gene, and the proliferation-associated gene *MKI67* that encodes the proliferation-related antigen Ki-67. *NF1* expression was similar in the 3 groups of tumors whereas *MKI67* showed significant overexpression (30.5-fold) in MPNSTs ($P = 0.00005$; Fig. 1 and Supplementary Table S4). This lack of expression difference for *NF1* is probably because of the fact that the *NF1* gene is ubiquitously expressed and therefore expressed in the different cell components of the neurofibromas and MPNSTs, and that $NF1^{-/-}$ Schwann cells represent only a fraction of the total Schwann cell population in tumor samples.

The immunohistochemical study of β-catenin in MPNSTs showed a strong diffuse and cytoplasmic staining (Fig. 2). In contrast, a weaker β-catenin staining was observed in the plexiform neurofibromas (Fig. 2).

mRNA expression of 32 identified Wnt pathway genes in paired plexiform neurofibroma and MPNST samples from 4 patients

We analyzed the mRNA levels of the 32 deregulated genes identified by "screening set" analysis in 4 patients from whom both plexiform neurofibroma and matched MPNST samples were available. We found a clear decrease in the mRNA level of *WNT9A*, *DKK3*, *SFRP4* (all patients), and *WISP1* (patients 1, 3, and 4), upon progression from plexiform neurofibroma to MPNST (Supplementary Fig. S2). We also found a clear increase in the mRNA level of *DKK1* (all patients), *TLE2*, *TCF7*, *WNT2* (patients 1, 2, and 3), and *WNT5A* (patients 3 and 4) during this transition (Supplementary Fig. S2).

mRNA expression of the 24 differentially expressed Wnt pathway genes in 4 non-NF1 (sporadic) MPNSTs

The expression levels of the 24 differentially expressed Wnt pathway genes were also determined in 4 non-NF1 (sporadic) human MPNST biopsies (Supplementary Table S5). According with the data obtained in NF1-associated MPNSTs, the majority of the 14 genes upregulated and of the 6 downregulated in MPNST biopsies showed a trend to be also up- and downregulated.

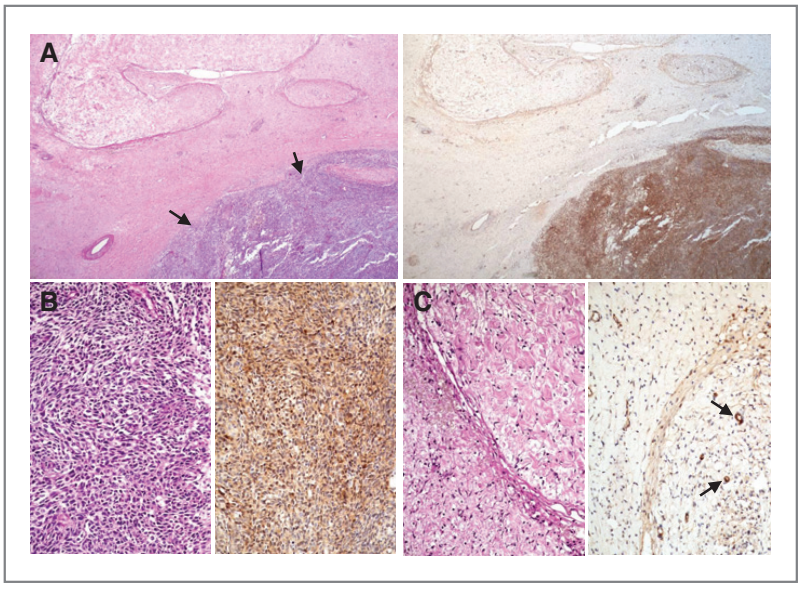


Figure 2. Representative immunohistochemical study of β-catenin in MPNST and plexiform neurofibroma. A, this tissue sample shows an area of plexiform neurofibroma surrounding the MPNST (arrows). The MPNST shows an intense β-catenin staining (left: hematoxylin, eosin, and saffron stain; right: immunohistochemistry revealed by diaminobenzindine, original magnifications ×25). B, the MPNST areas show a diffuse and cytoplasmic expression of β-catenin (left: hematoxylin, eosin, and saffron stain; right: immunohistochemistry revealed by diaminobenzindine, original magnifications ×200). C, the plexiform neurofibromas show a weak cytoplasmic expression of β-catenin in a proportion of Schwann cells, whereas intratumoral vessels are strongly stained, taken as internal positive controls (left: hematoxylin, eosin, and saffron stain; right: immunohistochemistry revealed by diaminobenzindine, original magnifications ×200).

mRNA expression of the 24 differentially Wnt pathway expressed genes in normal human Schwann cells, fibroblasts, endothelial cells, and mast cells

Neurofibromas and MPNSTs are both heterogeneous tumors mainly composed of Schwann cells (60–80%), together with fibroblasts, mast cells, and endothelial cells (3). To investigate cell type–specific expression of the 24 previously identified altered genes in NF1 plexiform neurofibromas and/or MPNSTs (Fig. 1 and Supplementary Table S4), we analyzed their mRNA levels by means of real-time RT-PCR in normal human Schwann cells, fibroblasts, endothelial cells, and mast cells (Table 1). *MYC*, *CAMK2B*, *KREMEN1*, and *BMP2* were similarly expressed in the 4 cell types, suggesting a ubiquitous expression. *TLE2*, *DKK3*, *TCF7*, *FZD1*, *FZD8*, and *DKK1* were similarly expressed in Schwann cells, fibroblasts, and endothelial cells, but were not expressed in mast cells. Six of these 24 genes (*WISP1*, *WNT5A*, *SFRP1*, *ID2*, *TWIST1*, and *SOX9*) were similarly expressed in Schwann cells and fibroblasts, but were not expressed (Ct > 32) in endothelial cells or mast cells. *WNT2*, *MSX2*, *LEF1*, *SFRP4*, and *SFRP5* were Schwann cell–specific, being expressed more than 20 times in the Schwann cells than in the other 3 cell types. *PRKCQ* was mainly expressed in endothelial cells and mast cells, and *WIF1* only in Schwann cells and endothelial cells. Finally, *WNT9A* was endothelial cells specific (being expressed 10 times more than in the other 3 cell types). It is noteworthy that the endothelial cells specificity of *WNT9A* could explain its expression profile in NF1 tumors, in particular its overexpression in plexiform neurofibromas (well-known to be more angiogenic than the dermal neurofibromas).

Table 1. mRNA expression of 24 identified genes in normal human cells

	Mast cells	Schwann cells	Fibroblasts	Endothelial cells
Wnt ligands ($n = 3$)				
WNT2	0.00	**0.28**[a]	0.00	0.00
WNT5A	0.00	**33.84**	**39.80**	**0.20**
WNT9A	0.01	0.04	0.03	**0.47**
Wnt receptors ($n = 2$)				
FZD1	0.03	**0.44**	**1.30**	**0.13**
FZD8	0.00	**3.70**	**0.21**	**0.87**
Wnt signal transduction ($n = 8$)				
DKK1	0.00	**486.00**	**930.00**	**396.00**
DKK3	0.01	**3.71**	**0.64**	**0.29**
KREMEN1	**0.03**	**0.13**	**0.40**	**0.10**
SFRP1	0.00	**0.55**	**0.27**	0.02
SFRP4	0.00	**0.83**	0.02	0.00
SFRP5	0.00	**0.62**	0.00	0.03
TLE2	0.00	**0.11**	**0.30**	**0.41**
WIF1	0.00	**1.05**	0.00	**0.60**
Wnt transcriptional factors ($n = 2$)				
LEF1	0.00	**0.38**	0.00	0.01
TCF7	0.00	**0.40**	**0.72**	**0.20**
Lef/Tcf-inducible proteins ($n = 7$)				
ID2	0.18	**2.84**	**17.90**	0.19
MSX2	0.00	**0.96**	0.00	0.04
MYC	**0.55**	**0.82**	**0.45**	**0.56**
SOX9	0.00	**0.93**	**0.31**	0.00
WISP1	0.00	**10.65**	**5.16**	0.02
TWIST1	0.00	**0.60**	**7.02**	0.01
BMP2	0.40	**0.30**	**5.96**	**21.38**
Noncanonical Wnt signal: Wnt/calcium pathway ($n = 2$)				
CAMK2B	**0.60**	**1.26**	**0.46**	**2.46**
PRKCQ	**2.28**	0.08	0.00	**1.11**

NOTE: The gene mRNA levels (calculated as described in Materials and Methods) were based on the amount of the target message relative to the endogenous control *TBP* message, in order to normalize the starting amount and quality of total RNA. Similar results were obtained with a second endogenous control, the *RPLP0* gene (also known as 36B4).

Genes indicated in bold were found to be highly expressed as compared with one or several other normal human cells.

[a]For each gene, mRNA levels were normalized to the 10 dermal neurofibromas.

mRNA expression of the 24 differentially expressed Wnt pathway genes in 7 NF1-associated MPNST cell lines

The expression levels of the 24 identified genes was determined in 7 well-characterized NF1-associated MPNST cell lines, namely NMS-2, NMS-2PC, 88-3, ST88-14, 90-8, S462, and T265 (Table 2). All genes (except *WT9A* in agreement with the fact that it is an endothelial cell–specific gene) were expressed (Ct < 32) in at least 1 NF1-associated MPNST cell line. According with the data obtained in MPNSTs, the majority of the 14 genes upregulated and of the 6 downregulated in MPNST biopsies was also up- and downregulated (>3-fold the median value in 10 dermal neurofibromas) in a fraction of the MPNST cell lines. For example, *WT5A*, *FZD8*, *DKK1*, *WIF1*, *MSX2*, and *CAMK2B* were upregulated in at least 5 of the 7 MPNST cell lines, whereas *WNT2*, *WNT9A*, *DKK3*, *KREMEN1*, and *SFRP1* were downregulated in at least 5 of the 7 MPNST cell lines. These findings confirm the Schwann cell expression of these genes and their dysregulation in MPNST tumorigenesis.

Relationship between mRNA levels of 24 differentially expressed Wnt pathway genes and 2 major stem cell markers (*PROM1* and *NKX2.2*)

Several studies supported the role of the canonical Wnt signaling in the formation and maintenance of stem cells and cancer stem cells (14, 20–22). To explore the possible involvement of the 24 identified Wnt genes (deregulated in NF1 tumors) in the formation of cancer stem cells, we tested the relationship between the expression of these 24 differentially expressed Wnt genes and 2 major stem cell marker genes, that is *PROM1* (also known as *CD133*) and *NKX2-2*, in our series of 57 NF1-associated tumors. *PROM1* and *NKX2-2* were overexpressed (144- and 87-fold, respectively) in MPNSTs ($P = 0.0007$ and 0.002, respectively; Mann–Whitney *U* test) suggesting an increase of the proportion of cancer stem cells in this malign tumor group. We observed

Table 2. mRNA expression of 24 identified genes in 7 NF1-associated MPNST cell lines

	NMS-2	NMS-2PC	88-3	ST88-14	90-8	S462	T265
Wnt ligands ($n = 3$)							
WNT2	**0,08**[a]	**0.04**	**0.09**	**0.32**	**0.04**	**0.18**	0.44
WNT5A	**5.76**	**11.52**	**12.65**	**8.79**	1.42	1.13	**16.15**
WNT9A	**0.04**	**0.00**	**0.01**	**0.08**	**0.20**	**0.07**	**0.05**
Wnt receptors ($n = 2$)							
FZD1	1.21	0.96	0.44	1.33	0.56	**0.21**	0.32
FZD8	0.45	**3.99**	**3.56**	**4.17**	**6.93**	0.22	**5.38**
Wnt signal transduction ($n = 8$)							
DKK1	**868.00**	**716.00**	**796.00**	**6146.00**	**1252.00**	**806.00**	**1648.00**
DKK3	**0.12**	**0.10**	**0.23**	0.91	**0.17**	**0.03**	**0.23**
KREMEN1	**0.13**	0.36	**0.12**	0.45	**0.14**	**0.05**	**0.11**
SFRP1	**0.04**	**0.14**	0.42	**0.29**	**0.28**	**0.15**	**0.05**
SFRP4	**0.02**	**0.04**	**0.00**	**0.01**	**0.00**	**0.00**	**0.01**
SFRP5	2.71	0.70	0.57	0.63	**0.00**	1.19	0.88
TLE2	**0.11**	0.35	**0.22**	0.79	0.67	0.38	**0.12**
WIF1	**35.7**	**37.4**	**27.2**	**96.8**	**48.3**	**30.0**	**25.8**
Wnt transcriptional factors ($n = 2$)							
LEF1	0.63	0.98	**0.24**	0.61	**0.33**	0.55	**0.20**
TCF7	0.88	1.00	0.75	1.75	0.77	**0.14**	0.45
Lef/Tcf-inducible proteins ($n = 7$)							
ID2	**3.25**	0.41	1.17	0.76	0.35	1.30	0.95
MSX2	**38.20**	**14.00**	**11.80**	**8.00**	**3.28**	**4.80**	2.46
MYC	1.64	1.52	1.59	0.35	1.73	**3.96**	1.84
SOX9	1.25	**4.86**	1.80	**5.09**	2.43	**0.24**	1.12
WISP1	**0.18**	0.86	**0.11**	**0.00**	1.20	**0.12**	**0.02**
TWIST1	1.31	1.20	0.31	**3.50**	0.71	1.39	0.56
BMP2	0.92	0.96	**13.18**	**5.18**	0.86	0.20	**4.48**
Noncanonical Wnt signal: Wnt/calcium pathway ($n = 2$)							
CAMK2B	**12.18**	**18.36**	**4.08**	0.00	**3.54**	0.00	**3.48**
PRKCQ	**3.13**	0.91	**3.36**	**6.16**	1.92	1.95	2.00

NOTE: The genes indicated in bold were found to be differentially expressed.
[a]For each gene, mRNA levels were normalized to the 10 dermal neurofibromas.

Table 3. Relationship between mRNA levels of the 24 identified genes and stem cell marker and EMT marker genes

	Stem cell markers		EMT markers		
	PROM1	***NKX2-2***	***TWIST1***	***SLUG***	***CDH1***
Wnt ligands ($n = 3$)					
WNT2	**−0.355**[a] **$P = 0.007$**[b]	**−0.365** **$P = 0.005$**	+0.285 $P = 0.03$	NS	NS
WNT5A	**+0.484** **$P = 0.0002$**	**+0.353** **$P = 0.007$**	NS	NS	NS
WNT9A	−0.319 $P = 0.015$	−0.406 $P = 0.002$	NS	NS	NS
Wnt receptors ($n = 2$)					
FZD1	NS	NS	NS	NS	NS
FZD8	+0.398 $P = 0.02$	NS	**+0.468** **$P = 0.0003$**	NS	−0.278 $P = 0.03$
Wnt signal transduction ($n = 8$)					
DKK1	**+0.610** **$P = 0.000001$**	**+0.385** **$P = 0.003$**	+0.318 $P = 0.015$	NS	NS
DKK3	**−0.386** **$P = 0.003$**	**−0.413** **$P = 0.0015$**	NS	NS	NS
KREMEN1	**−0.439** **$P = 0.0008$**	**−0.327** **$P = 0.01$**	NS	NS	**+0.371** **$P = 0.0046$**
SFRP1	NS	NS	**+0.342** **$P = 0.009$**	NS	NS
SFRP4	NS	−0.296 $P = 0.024$	NS	−0.337 $P = 0.024$	NS
SFRP5	NS	NS	NS	−0.322 $P = 0.014$	NS
TLE2	NS	NS	NS	NS	NS
WIF1	**+0.527** **$P = 0.00004$**	**+0.609** **$P = 0.000001$**	+0.307 $P = 0.019$	**+0.392** **$P = 0.003$**	NS
Wnt transcriptional factors ($n = 2$)					
LEF1	NS	NS	NS	NS	NS
TCF7	**−0.520** **$P = 0.00006$**	**−0.400** **$P = 0.002$**	NS	NS	NS
Lef/Tcf-inducible proteins ($n = 7$)					
ID2	+0377 $P = 0.004$	NS	**+0.360** **$P = 0.006$**	NS	NS
MSX2	**+0.573** **$P = 0.000007$**	**+0.384** **$P = 0.003$**	**+0.433** **$P = 0.0009$**	+0.293 $P = 0.02$	NS
MYC	NS	NS	+0.305 $P = 0.02$	NS	NS
SOX9	NS	NS	**+0.344** **$P = 0.009$**	NS	NS
WISP1	**+0.630** **$P = 0.0000005$**	**+0.418** **$P = 0.001$**	+0.309 $P = 0.018$	+0.305 $P = 0.02$	NS
TWIST1	NS	NS	+1.000 $P < 10^{-7}$	+0.289 $P = 0.028$	NS
BMP2	+0.291 $P = 0.027$	+0.314 $P = 0.017$	**+0.377** **$P = 0.0039$**	**+0.505** **$P = 0.00009$**	NS
Noncanonical Wnt signal: Wnt/calcium pathway ($n = 2$)					
CAMK2B	+0.314 $P = 0.017$	NS	NS	NS	NS

(Continued on the following page)

Table 3. Relationship between mRNA levels of the 24 identified genes and stem cell marker and EMT marker genes (Cont'd)

	Stem cell markers		EMT markers		
	PROM1	***NKX2-2***	***TWIST1***	***SLUG***	***CDH1***
PRKCQ	NS	NS	+0.260 $P = 0.048$	+0.312 $P = 0.017$	NS

Abbreviation: NS, not significant.

[a]Spearman correlation coefficient.

[b]*P* value, Spearman rank correlation test.

The genes indicated in bold were found to be marked significantly differentially expressed ($P < 0.01$).

high statistical significant positive associations between *PROM1* and *NKX2-2*, and *WNT5A*, *DKK1*, *WIF1*, *MSX2*, and *WISP1* ($P < 0.01$ with both *PROM1* and *NKX2-2*), and high statistical significant negative associations between *PROM1* and *NKX2-2*, and *WNT2*, *DKK3*, *KREMEN1*, and *TCF7* ($P < 0.01$ with both *PROM1* and *NKX2-2*; Table 3).

Relationship between mRNA levels of 24 differentially Wnt pathway expressed genes and 5 major EMT markers (*TWIST1*, *SLUG*, *SNAIL*, *VIM*, and *CDH1*)

Regulation of the EMT is a crucial step in cancer development. *TWIST1*, an important transcription factor involved in EMT and upregulated in NF1-associated MPNST (19), is also a major LEF/TCF–inducible gene (http://www.stanford.edu/~rnusse/pathways/targets.html). In consequence, to explore the involvement of the Wnt pathway in a possible Schwann–mesenchymal transition during NF1 tumorigenesis, we first tested the expression of 5 major EMT markers (*TWIST1*, *SLUG*, *SNAIL*, *VIM*, and *CDH1*) in our series of 57 NF1-associated tumors. *TWIST1* and *SLUG* were overexpressed (1.6- and 2.1-fold, respectively) in the MPNSTs ($P = 0.005$ and 0.001, respectively), whereas *CDH1* was underexpressed (11-fold; $P = 0.0006$). *SNAIL* and *VIM* showed similar mRNA levels in dermal neurofibromas, plexiform neurofibromas, and MPNSTs. We next tested the relationship between the expression of the 24 identified Wnt genes and of the 3 differentially expressed EMT marker genes (i.e., *TWIST1*, *SLUG*, and *CDH1*). We observed high statistical significant positive associations ($P < 0.01$) between *TWIST1* and *FZD8*, *SFRP1*, *ID2*, *MSX2*, *SOX9*, and *BMP2*, between *SLUG* and *WIF1* and *BMP2*, and between *CDH1* and *KREMEN1*. *CDH1* and *KREMEN1* showed a correlated decreased expression in MPNSTs (Table 3). It is noteworthy that we observed a high statistical significant positive association between *SLUG* and both *PROM1* and *NKX2-2* ($P = 0.0033$ and 0.00068, respectively).

In vitro consequences of *NF1* inactivation on Wnt pathway activation state

To analyze the effects of the *NF1* gene inactivation on the Wnt pathway, we knocked down the expression of *NF1* in 2 human cell lines (an embryonic kidney cell line: HEK293 and a breast adenocarcinoma cell line: MCF-7) and 1 mouse Schwann cell line (MSC80) by siRNAs strategy. Cells were transfected with either a nontargeting siRNA (NT) or a siRNA directed against *NF1*. The efficacy of the knockdown of the *NF1* expression was tested by real-time RT-PCR and Western blot. In MSC80 cell line, we found a decreased *Nf1* expression at both mRNA and protein (neurofibromin) levels (Fig. 3A). In human cell lines (HEK293 and MCF-7), a decreased *NF1* expression was confirmed at mRNA level (data not shown).

In the 2 human cell lines (HEK293 and MCF-7), mRNA expression of 24 Wnt pathway genes (cf. supra) was analyzed after the knockdown of *NF1*. Those 2 non-Schwann cell lines showed no clear Wnt gene expression difference for the majority of the 14 upregulated and the 6 downregulated genes in MPNST biopsies and no difference was found in the amount of the active as well as the total β-catenin quantified by Western blot (data not shown).

Similarly, no clear expression difference was found between the MEFs derived from wild-type mice and the MEFs derived from $Nf1^{-/-}$ mice, in the majority of the 14 upregulated and of the 6 downregulated genes in MPNST biopsies (data not shown).

In MSC80 Schwann cells, we used a Wnt pathway reporter assay to determine whether the canonical Wnt signaling pathway was modulated after the knockdown of *Nf1*. The silencing of *Nf1* increased by 3-folds ($P < 0.01$) the promoter activity of SuperTOP-Flash-Luc in MSC80 (Fig. 3B). The knockdown of *Nf1* did not alter the promoter activity of SuperFOP-Flash-Luc, a construct that lacks any binding sites for TCF/LEF transcription factors (Fig. 3B). Furthermore, the transcript of *Axin2*, a target gene of Wnt pathway was increased by 2-folds after the silencing of *Nf1* in MSC80 cells (Fig. 3C). To assess whether the knockdown of *Nf1* altered the expression of β-catenin at the protein level, we have quantified by Western blot the amount of the active as well as the total β-catenin. In MSC80 transfected with the siRNA against *Nf1*, we observed a 2-folds increase of the ratio of active-β-catenin/total-β-catenin compared with the control cells (Fig. 3D).

Altogether, those data show that the knockdown of *NF1* in Schwann cells enhances the activity of Wnt/β-catenin pathway. Those data suggest cell type–specific

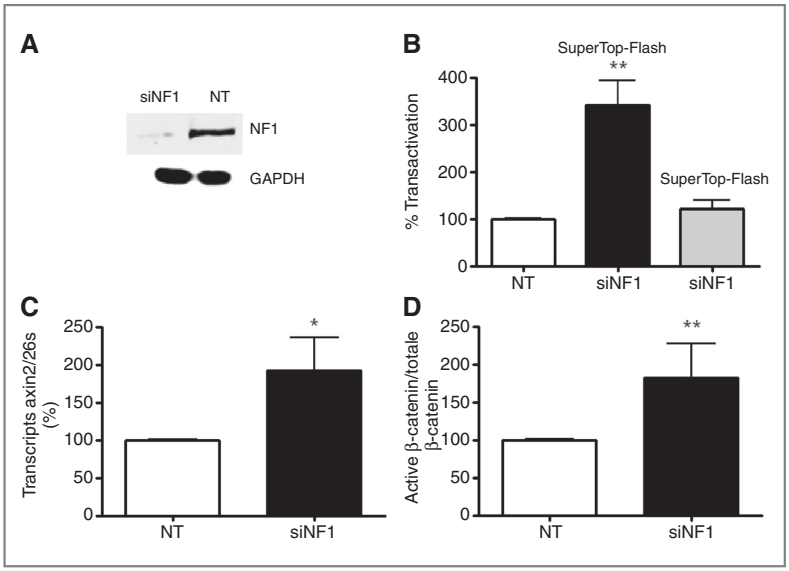


Figure 3. Effect of *Nf1* knockdown on Wnt pathway in MSC80 cells. A, MSC80 cells were transfected with either siRNA-targeting *NF1* or nontargeting siRNA (NT). Western blots using anti-neurofibromin antibodies were perfomed to verify Nf1 inactivation at protein level in MSC80 cells. GAPDH was used to normalize the Western blots. Results were reproduced in 3 independent experiments, and figures represent a typical experiment. B, MSC80 cells were transiently cotransfected by the SuperTOP-Flash Luciferase or SuperFOP-Flash Luciferase plasmids with either nontargeting (NT) siRNA or siRNA against *NF1*. Luciferase activity was then analyzed. *, $P < 0.05$, and **, $P < 0.01$ by Tukey *post hoc* tests after one-way ANOVA when compared with control. C, MSC80 cells were transfected with either NT or a siRNA against *Nf1*. Total RNA was extracted and RT-qPCR was performed using specific primer recognizing *Axin2*. D, Western blots were performed using anti-active (dephosphorylated β-catenin) and anti-total β-catenin antibodies. GAPDH was used to normalize the Western blots. The Western blots were quantified using Image J software (rsb.info.nih.gov).

consequences of *NF1* knockdown as Wnt pathway activation was not observed in epithelial (MCF-7) or kidney (HEK293) cell lines, or in MEFs cells but only in Schwann (MSC80) cell lines.

Discussion

WNT signaling pathway orchestrates highly complex molecular events. Aberrant activation of Wnt pathway could trigger cell malignant transformation. In the last 20 years, involvement of the Wnt pathway has mainly been revealed in human epithelial malignancies (31). However, the Wnt pathway may also play a role in tumors of mesenchymal origin (32). Mesenchymal stem cells could differentiate into Schwann cell–like cells (33). In this work, we therefore apprehended the role of Wnt pathway in NF1 tumorigenesis and more particularly its link with cancer stem cells and putative Schwann–mesenchymal transition.

Wnt pathway is tightly implicated in the myelination process elicited by Schwann cells. We have shown that the selective inhibition of Wnt components by siRNA or dominant negative forms inhibits the expression of myelin genes in mouse Schwann cells (34, 35). Moreover, the activation of Wnt signaling by recombinant Wnt ligands increases the transcription of myelin genes. Importantly, loss-of-function analyses in zebrafish embryos show, *in vivo*, a key role for Wnt/β-catenin signaling in the initiation of myelination and in myelin sheath compaction in the central and peripheral nervous systems. Inhibition of Wnt/β-catenin signaling resulted in hypomyelination, without affecting Schwann cells and oligodendrocytes generation or axonal integrity (21). Thus, the dysregulation of this pathway could lead to either developmental defects or tumorigenesis.

Nine genes were significantly deregulated in plexiform neurofibromas (as compared with dermal neurofibromas): 8 genes were upregulated and 1 was downregulated (Table 4). All these genes (except *WNT9A*, which seems endothelial cell specific) were expressed in normal and tumoral Schwann cells (Table 2). Our results show that among the 3 different Wnt pathways, the canonical Wnt pathway is mainly involved in plexiform neurofibroma development with deregulation of genes encoding major components of this Wnt pathway (Table 4). Little is known about the relevance of these genes (except *MYC*) to cancer biology. A few observations have however described implications of these genes in several cancer types (36–40). Taken together, these findings suggest an alteration of the canonical Wnt pathway FZD1/SFRP1/TLE2/MYC in plexiform neurofibroma development.

Our results also showed a major activation of the Wnt canonical pathway during the malignant transformation of plexiform neurofibromas in MPNSTs from NF1 patients.

Table 4. Major deregulation of the Wnt pathway expression in plexiform neurofibromas and MPNSTs

Plexiform neurofibromas	MPNSTs	Human tumor types with previous described alterations in WNT pathway components
Wnt canonical pathway:	● Upregulated genes	
FZD1, *SFRP4*, *SFRP5*, *TLE2*, and *MYC*	***FZD1***, *FZD8*, *DKK1*, *WIF1*, *LEF1*, *MSX2*, *ID2*, *WISP1*, *BMP2*, *TWIST1*, and *SOX9*	Neuroblastoma (36), colorectal cancer (37), and astrocytoma (39), sarcoma (31)
	● Downregulated genes	
SFRP1	*WNT2*, ***SFRP1***, *DKK3*, *KREMEN1*, and *TCF7*	Breast carcinoma (38), Melanoma (40)
β-Catenin-independant Wnt pathway:	● Wnt/calcium pathway: upregulated genes	
WNT9A, ***CAMK2B*** and ***PRKCQ***	*WNT5A*, ***CAMK2B*** and ***PRKCQ***	Melanoma (42–44)
	● Wnt/calcium pathway: downregulated genes *WNT9A*	

The genes indicated in bold were found altered both in plexiform neurofibromas and in MPNSTs.
The canonical Wnt pathway is mainly involved in plexiform neurofibromas and MPNSTs. Eight genes were significantly upregulated (*WNT9A*, *FZD1*, *SFRP4*, *SFRP5*, *TLE2*, *MYC*, *CAMK2B*, and *PRKCQ*) and one was downregulated (*SFRP1*) in plexiform neurofibromas (as compared with dermal neurofibromas). Fourteen genes were significantly upregulated (*WT5A*, *FZD1*, *FZD8*, *DKK1*, *WIF1*, *LEF1*, *MSX2*, *ID2*, *WISP1*, *BMP2*, *TWIST1*, *SOX9*, *CAMK2B*, and *PRKCQ*), and 6 were downregulated (*WNT2*, *WNT9A*, *SFRP1*, *DKK3*, *KREMEN1*, and *TCF7*) in MPNSTs.

Indeed, 20 genes were significantly deregulated in the 16 NF1-related MPNSTs and the 7 MPNST cell lines (Fig. 1 and Supplementary Table S4). These deregulated genes encode molecules mainly involved in the canonical Wnt pathway (Table 4). Among them, *TWIST1* and more recently *SOX9* have already been identified as major genes involved in NF1 tumorigenesis (19, 41). By using immunohistochemical analysis, we confirmed an activation of the Wnt canonical pathway during the malignant transformation of plexiform neurofibromas in MPNSTs from NF1 patients (Fig. 3).

Wnt pathway expression analysis in a small set of non-NF1 (sporadic) MPNSTs also suggested an activation of the canonical Wnt pathway, as in the NF1-related MPNSTs. Our observation confirms previous results showing no difference in whole transcriptome profiling between sporadic and NF1-related MPNSTs that both present inactivation of the 2 *NF1* alleles (42).

An activation of the noncanonical Wnt/calcium pathway was also shown during the malignant transformation of plexiform neurofibromas in MPNSTs. Finally, our results showed a total absence of involvement of the second noncanonical Wnt pathway-planar cell polarity pathway—both in plexiform neurofibroma genesis, as well as in MPNSTs.

Very little is known about the link between Wnt pathway and receptor tyrosine kinase (RTK) RAS/MAPK and PI3K/AKT signaling pathways that are activated in NF1 tumorigenesis *via* the inactivation of the neurofibromin (encoded by *NF1*), which functions as a negative regulator of the RAS proteins. However, several studies with culture cells showed that activation of various tyrosine kinases (ERBB2, MET, and RON) can increase β-catenin signaling (43–45). Moreover, STI-571 (Glivec), a tyrosine kinase inhibitor, downregulates the β-catenin–signaling activity and suppresses cell proliferation (46). Finally, additional studies showed that RAS pathway activation can strongly cooperate with Wnt signaling to drive development of several type of carcinoma *in vivo* (47, 48), and that PI3K/AKT pathway can regulate Wnt signaling in various cancers (49). Our study emphasizes the potential cooperative link between Wnt pathway and RAS/MAPK and PI3K/AKT signaling pathways in NF1-associated tumorigenesis. To translate our observations into potential therapies, further studies will crucial to know which pathway(s) are critical for this link.

We confirmed the NF1/WNT pathway crosstalk at the functional level. We showed that the silencing of the *Nf1* gene stimulated Wnt pathway activation in Schwann cell lines, as in an *in vitro* model. *Nf1* knockdown induced (i) a Wnt pathway luciferase reporter assay activation, and (ii) an increased active-β-catenin/total-β-catenin ratio (Fig. 3). Our data also suggest Schwann cell–specific consequences of *NF1* knockdown as no significant Wnt gene expression variation was found in 3 non-Schwann cell types (HEK293, MCF-7, and MEFs).

We observed a strong association between Wnt pathway activation and both cancer stem cell reservoir (as judged on the expression level of stem cell markers *PROM1* and *NKX2.2*) and Schwann–mesenchymal transition (as judged on the expression level of EMT markers *TWIST1*, *SLUG*, and *CDH1*; Table 3). It is noteworthy that *NKX2.2* and *TWIST1* are major Wnt targets (http://www.stanford.edu/~rnusse/pathways/targets.html; ref. 50). Several studies suggested that mesenchymal stem cells could differentiate into Schwann cell–like cells in physiological conditions (32). In consequence, activation of Wnt signaling in NF1 tumorigenesis could promote the dedifferentiation of the tumoral

Schwann cells into tumoral mesenchyme cell-like. During the process of Schwann cell–mesenchyme transition, cell–cell adhesion may be downregulated and a mesenchymal phenotype acquired, associated with increased interaction with the extracellular matrix and an enhanced migratory capacity. These mesenchyme cell-like could be characterized by a higher ability to self-renew and to induce tumorigenesis, both characteristics of cancer stem cells. In this regard, we previously showed a downexpression of several key genes in the Schwann cell lineage (*ERBB3*, *ITGB4*, and *SOX1*) as well as that the deregulation of the Hedgehog pathway (19). Wnt, Hedgehog, and Notch pathways are the 3 major signaling pathways that regulate the proliferation of both endogenous normal stem cells and cancer stem cells (22). For example, Clement and colleagues suggest the Hedgehog pathway is involved in the regulation of the glioma cancer stem cells (51).

Finally, we assume that activation of the Wnt signaling pathway in NF1 tumorigenesis could explain the numerous skeletal manifestations in NF1 patients. Indeed, Wnt signaling is suggested to be the major common pathway leading to bone formation, with bone morphogenetic proteins (BMP) as only factors capable of initiating osteoblastogenesis from mesenchymal progenitors. Double inactivation of the *NF1* gene was observed in bone dysplasia found in NF1 (52). In this study, we showed upregulation of *BMP2* in MPNST samples. We can hypothesize that activation of Wnt pathway impaired $NF1^{-/-}$ osteoblasts differentiation, and has a major role in osseous abnormalities observed in the patients with NF1.

In conclusion, our study reveals that activation of the Wnt signaling pathway is consistently seen in NF1 tumorigenesis. Full confirmation of the role of this pathway in NF1 needs further *in vivo* (animal model) studies. Our results also suggest that Wnt inhibitors may represent a new therapeutic strategy for NF1.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Authors' Contributions

Conception and design: M. Hivelin, M. Vidaud, I. Bièche, C. Massaad, E. Pasmant

Development of methodology: A. Luscan, B. Parfait, I. Bièche

Acquisition of data (provided animals, acquired and managed patients, provided facilities, etc.): A. Luscan, G. Shackleford, N. Ortonne, F. Lallemand, K. Leroy, V. Dumaine, M. Hivelin, D. Borderie, L. Valeyrie-Allanore, F. Larousserie, B. Terris, L. Lantieri, P. Wolkenstein, I. Bièche

Analysis and interpretation of data (e.g., statistical analysis, biostatistics, computational analysis): A. Luscan, G. Shackleford, J. Masliah-Planchon, N. Ortonne, F. Lallemand, B. Parfait, I. Bièche, C. Massaad

Writing, review, and/or revision of the manuscript: A. Luscan, N. Ortonne, M. Hivelin, L. Valeyrie-Allanore, P. Wolkenstein, B. Parfait, I. Bièche, C. Massaad, E. Pasmant

Administrative, technical, or material support (i.e., reporting or organizing data, constructing databases): A. Luscan, I. Laurendeau, J. Varin, T. De Raedt, D. Vidaud, I. Bièche, E. Pasmant

Study supervision: M. Vidaud, I. Bièche, E. Pasmant

Acknowledgments

Sporadic MPNST samples were provided by CRB-PATHOLOGIE-COCHIN from service d'anatomie et cytologie pathologiques de l'hôpital Cochin.

Grant Support

This work was supported by Association pour la Recherche sur le Cancer, Association Neurofibromatoses et Recklinghausen, Ligue Française Contre les Neurofibromatoses, and Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

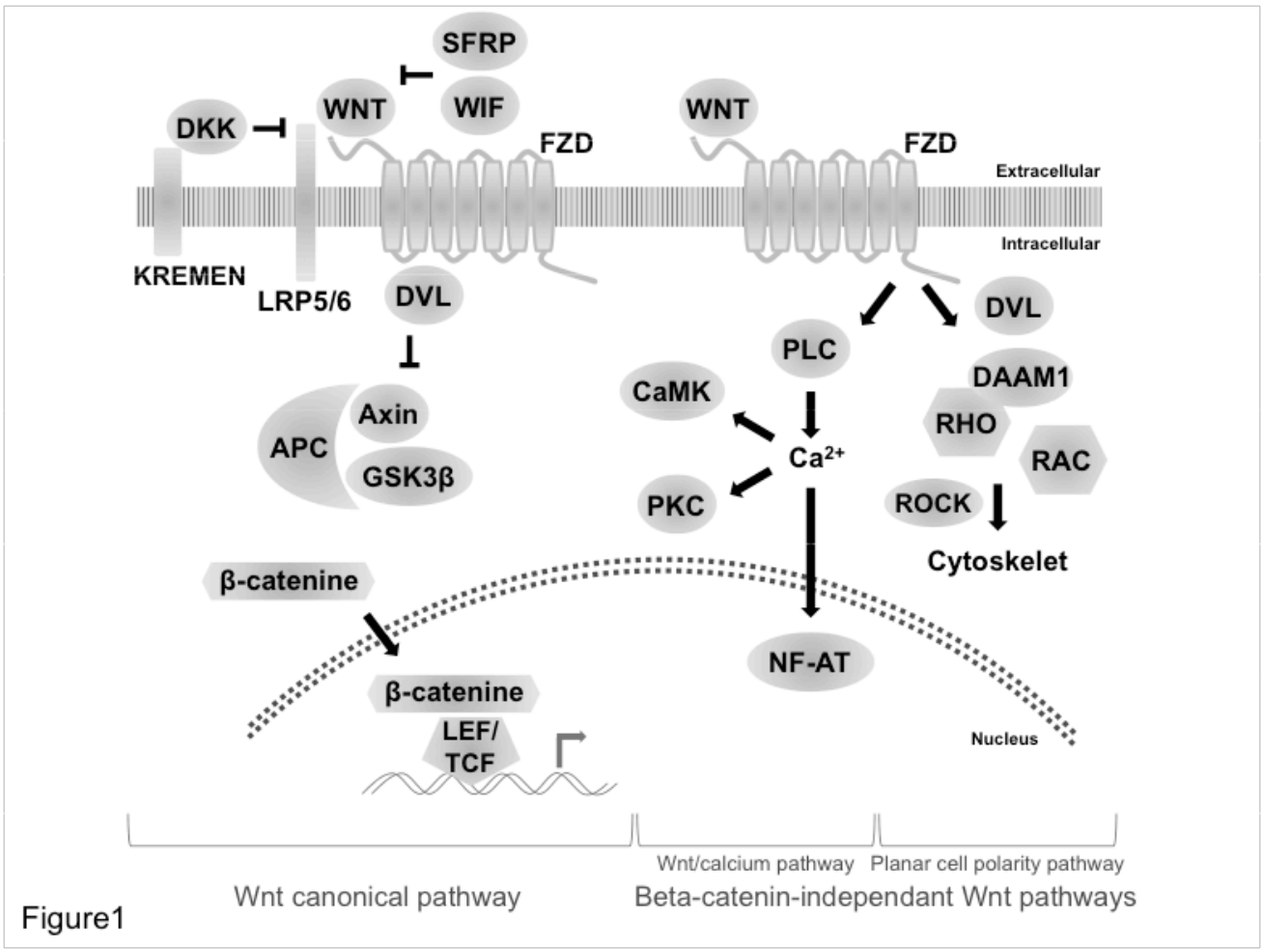
The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Received March 22, 2013; revised September 27, 2013; accepted October 20, 2013; published OnlineFirst November 11, 2013.

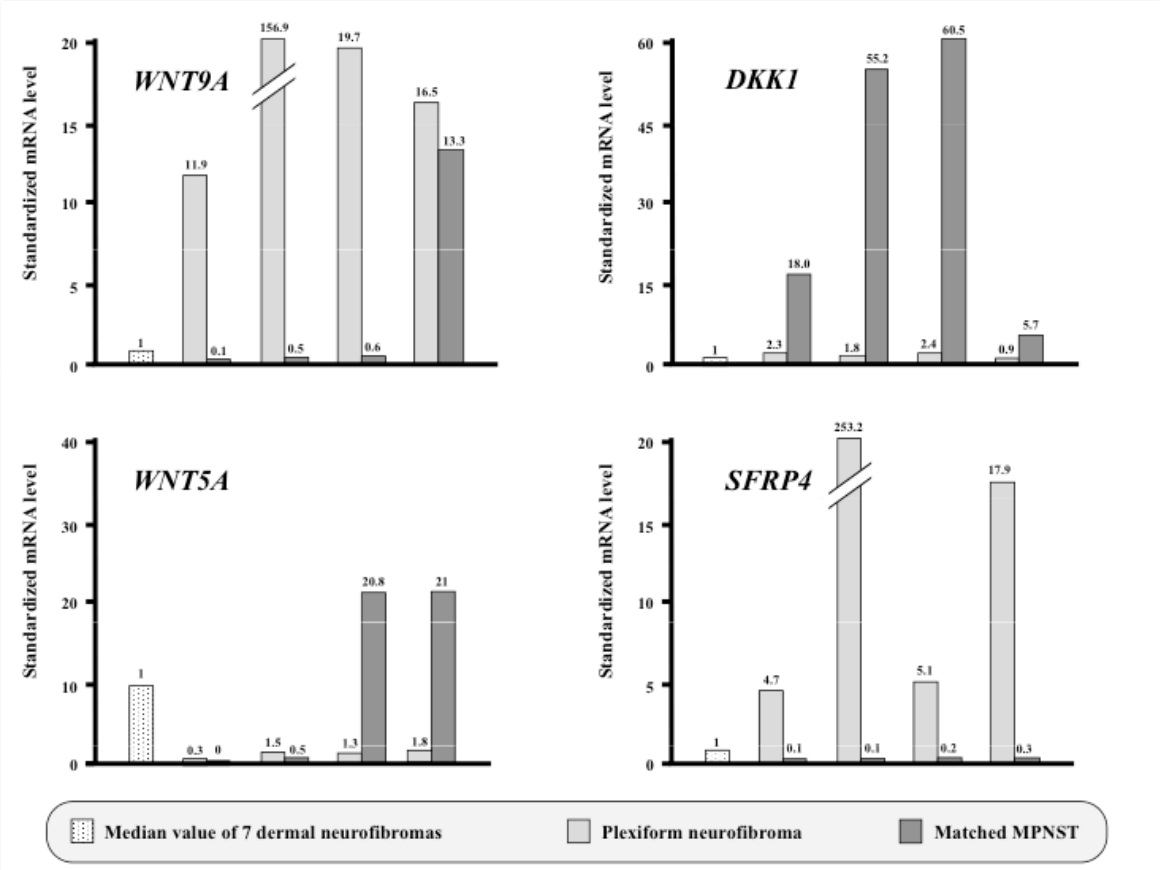
References

1. Friedman JM. Epidemiology of neurofibromatosis type 1. Am J Med Genet 1999;89:1–6.
2. Sabbagh A, Pasmant E, Laurendeau I, Parfait B, Barbarot S, Guillot B, et al. Unravelling the genetic basis of variable clinical expression in neurofibromatosis 1. Hum Mol Genet 2009;18:2768–78.
3. Zhu Y, Ghosh P, Charnay P, Burns DK, Parada LF. Neurofibromas in NF1: Schwann cell origin and role of tumor environment. Science 2002;296:920–2.
4. Zheng H, Chang L, Patel N, Yang J, Lowe L, Burns DK, et al. Induction of abnormal proliferation by nonmyelinating schwann cells triggers neurofibroma formation. Cancer Cell 2008;13:117–28.
5. Le LQ, Shipman T, Burns DK, Parada LF. Cell of origin and microenvironment contribution for NF1-associated dermal neurofibromas. Cell Stem Cell 2009;4:453–63.
6. Leroy K, Dumas V, Martin-Garcia N, Falzone MC, Voisin MC, Wechsler J, et al. Malignant peripheral nerve sheath tumors associated with neurofibromatosis type 1: a clinicopathologic and molecular study of 17 patients. Arch Dermatol 2001;137:908–13.
7. Tucker T, Wolkenstein P, Revuz J, Zeller J, Friedman JM. Association between benign and malignant peripheral nerve sheath tumors in NF1. Neurology 2005;65:205–11.
8. Menon AG, Anderson KM, Riccardi VM, Chung RY, Whaley JM, Yandell DW, et al. Chromosome 17p deletions and p53 gene mutations associated with the formation of malignant neurofibrosarcomas in von Recklinghausen neurofibromatosis. Proc Natl Acad Sci U S A 1990;87:5435–9.
9. Kourea HP, Cordon-Cardo C, Dudas M, Leung D, Woodruff JM. Expression of p27(kip) and other cell cycle regulators in malignant peripheral nerve sheath tumors and neurofibromas: the emerging role of p27(kip) in malignant transformation of neurofibromas. Am J Pathol 1999;155:1885–91.
10. Nielsen GP, Stemmer-Rachamimov AO, Ino Y, Moller MB, Rosenberg AE, Louis DN. Malignant transformation of neurofibromas in neurofibromatosis 1 is associated with CDKN2A/p16 inactivation. Am J Pathol 1999;155:1879–84.
11. DeClue JE, Heffelfinger S, Benvenuto G, Ling B, Li S, Rui W, et al. Epidermal growth factor receptor expression in neurofibromatosis type 1-related tumors and NF1 animal models. J Clin Invest 2000;105:1233–41.
12. Perrone F, Tabano S, Colombo F, Dagrada G, Birindelli S, Gronchi A, et al. p15INK4b, p14ARF, and p16INK4a inactivation in sporadic and neurofibromatosis type 1-related malignant peripheral nerve sheath tumors. Clin Cancer Res 2003;9:4132–8.
13. Polyak K, Hahn WC. Roots and stems: stem cells in cancer. Nat Med 2006;12:296–300.
14. Reya T, Clevers H. Wnt signalling in stem cells and cancer. Nature 2005;434:843–50.
15. Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. Cell 2009;139:871–90.

16. Joseph NM, Mosher JT, Buchstaller J, Snider P, McKeever PE, Lim M, et al. The loss of Nf1 transiently promotes self-renewal but not tumorigenesis by neural crest stem cells. Cancer Cell 2008;13: 129–40.
17. Williams JP, Wu J, Johansson G, Rizvi TA, Miller SC, Geiger H, et al. Nf1 mutation expands an EGFR-dependent peripheral nerve progenitor that confers neurofibroma tumorigenic potential. Cell Stem Cell 2008;3:658–69.
18. Lévy P, Vidaud D, Leroy K, Laurendeau I, Wechsler J, Bolasco G, et al. Molecular profiling of malignant peripheral nerve sheath tumors associated with neurofibromatosis type 1, based on large-scale real-time RT-PCR. Mol Cancer 2004;3:20.
19. Miller SJ, Rangwala F, Williams J, Ackerman P, Kong S, Jegga AG, et al. Large-scale molecular comparison of human schwann cells to malignant peripheral nerve sheath tumor cell lines and tissues. Cancer Res 2006;66:2584–91.
20. Angers S, Moon RT. Proximal events in Wnt signal transduction. Nat Rev Mol Cell Biol 2009;10:468–77.
21. Klaus A, Birchmeier W. Wnt signalling and its impact on development and cancer. Nat Rev Cancer 2008;8:387–98.
22. Takebe N, Harris PJ, Warren RQ, Ivy SP. Targeting cancer stem cells by inhibiting Wnt, Notch, and Hedgehog pathways. Nat Rev Clin Oncol 2011;8:97–106.
23. Avellana-Adalid V, Bachelin C, Lachapelle F, Escriou C, Ratzkin B, Baron-Van Evercooren A. *In vitro* and *in vivo* behaviour of NDF-expanded monkey Schwann cells. Eur J Neurosci 1998;10:291–300.
24. Bachelin C, Lachapelle F, Girard C, Moissonnier P, Serguera-Lagache C, Mallet J, et al. Efficient myelin repair in the macaque spinal cord by autologous grafts of Schwann cells. Brain 2005;128:540–9.
25. Rosenbaum T, Rosenbaum C, Winner U, Müller HW, Lenard HG, Hanemann CO. Long-term culture and characterization of human neurofibroma-derived Schwann cells. J Neurosci Res 2000;61: 524–32.
26. Royer B, Varadaradjalou S, Saas P, Gabiot AC, Kantelip B, Féger F, et al. Autocrine regulation of cord blood-derived human mast cell activation by IL-10. J Allergy Clin Immunol 2001;108:80–6.
27. Boutry JM, Hauw JJ, Gansmuller A, Di-Bert N, Pouchelet M, Baron-Van Evercooren A. Establishment and characterization of a mouse Schwann cell line which produces myelin *in vivo*. J Neurosci Res 1992;32:15–26.
28. Pasmant E, Masliah-Planchon J, Lévy P, Laurendeau I, Ortonne N, Parfait B, et al. Identification of genes potentially involved in the increased risk of malignancy in NF1-microdeleted patients. Mol Med 2011;17:79–87.
29. Pasmant E, Ortonne N, Rittié L, Laurendeau I, Lévy P, Lazar V, et al. Differential expression of CCN1/CYR61, CCN3/NOV, CCN4/WISP1, and CCN5/WISP2 in neurofibromatosis type 1 tumorigenesis. J Neuropathol Exp Neurol 2010;69:60–9.
30. Massaad C, Garlatti M, Wilson EM, Cadepond F, Barouki R. A natural sequence consisting of overlapping glucocorticoid-responsive elements mediates glucocorticoid, but not androgen, regulation of gene expression. Biochem J 2000;1:123–9.
31. Behrens J, Lustig B. The Wnt connection to tumorigenesis. Int J Dev Biol 2004;48:477–87.
32. Matushansky I, Hernando E, Socci ND, Mills JE, Matos TA, Edgar MA, et al. Derivation of sarcomas from mesenchymal stem cells via inactivation of the Wnt pathway. J Clin Invest 2007;117:3248–57.
33. Brohlin M, Mahay D, Novikov LN, Terenghi G, Wiberg M, Shawcross SG, et al. Characterisation of human mesenchymal stem cells following differentiation into Schwann cell-like cells. Neurosci Res 2009;64: 41–9.
34. Tawk M, Makoukji J, Belle M, Fonte C, Trousson A, Hawkins T, et al. Wnt/β-catenin signaling is an essential and direct driver of myelin gene expression and myelinogenesis. J Neurosci 2011;31:3729–42.
35. Makoukji J, Belle M, Meffre D, Stassart R, Grenier J, Shackleford G, et al. Lithium enhances remyelination of peripheral nerves. Proc Natl Acad Sci U S A 2012;109:3973–8.
36. Flahaut M, Meier R, Coulon A, Nardou KA, Niggli FK, Martinet D, et al. The Wnt receptor FZD1 mediates chemoresistance in neuroblastoma through activation of the Wnt/β-catenin pathway. Oncogene 2009;28: 2245–56.
37. Tang D, Liu J, Wang DR, Yu HF, Li YK, Zhang JQ. Diagnostic and prognostic value of the methylation status of secreted frizzled-related protein 2 in colorectal cancer. Clin Invest Med 2011;34:E88–95.
38. Cowling VH, D'Cruz CM, Chodosh LA, Cole MD. c-Myc transforms human mammary epithelial cells through repression of the Wnt inhibitors DKK1 and SFRP1. Mol Cell Biol 2007;27:5135–46.
39. Rorive S, Maris C, Debeir O, Sandras F, Vidaud M, Bièche I, et al. Exploring the distinctive biological characteristics of pilocytic and low-grade diffuse astrocytomas using microarray gene expression profiles. J Neuropathol Exp Neurol 2006;65:794–807.
40. Kuphal S, Lodermeyer S, Bataille F, Schuierer M, Hoang BH, Bosserhoff AK. Expression of Dickkopf genes is strongly reduced in malignant melanoma. Oncogene 2006;25:5027–36.
41. Miller SJ, Jessen WJ, Mehta T, Hardiman A, Sites E, Kaiser S, et al. Integrative genomic analyses of neurofibromatosis tumours identify SOX9 as a biomarker and survival gene. EMBO Mol Med 2009;1: 236–48.
42. Endo M, Yamamoto H, Setsu N, Kohashi K, Takahashi Y, Ishii T, et al. Prognostic significance of AKT/mTOR and MAPK pathways and antitumor effect of mTOR inhibitor in NF1-related and sporadic malignant peripheral nerve sheath tumors. Clin Cancer Res 2013;19: 450–61.
43. Dissanayake SK, Olkhanud PB, O'Connell MP, Carter A, French AD, Camilli TC, et al. Wnt5A regulates expression of tumor-associated antigens in melanoma via changes in signal transducers and activators of transcription 3 phosphorylation. Cancer Res 2008;68:10205–14.
44. Danilkovitch-Miagkova A, Miagkov A, Skeel A, Nakaigawa N, Zbar B, Leonard EJ. Oncogenic mutants of RON and MET receptor tyrosine kinases cause activation of the β-catenin pathway. Mol Cell Biol 2001;21:5857–68.
45. Bonvini P, An WG, Rosolen A, Nguyen P, Trepel J, Garcia de Herreros A, et al. Geldanamycin abrogates ErbB2 association with proteasome-resistant β-catenin in melanoma cells, increases β-catenin-E-cadherin association, and decreases β-catenin-sensitive transcription. Cancer Res 2001;61:1671–7.
46. Zhou L, An N, Haydon RC, Zhou Q, Cheng H, Peng Y, et al. Tyrosine kinase inhibitor STI-571/Gleevec down-regulates the β-catenin signaling activity. Cancer Lett 2003;193:161–70.
47. Phelps RA, Chidester S, Dehghanizadeh S, Phelps J, Sandoval IT, Rai K, et al. A two-step model for colon adenoma initiation and progression caused by APC loss. Cell 2009;137:623–34.
48. Pearson HB, Phesse TJ, Clarke AR. K-ras and Wnt signaling synergize to accelerate prostate tumorigenesis in the mouse. Cancer Res 2009;69:94–101.
49. Nteliopoulos G, Marley SB, Gordon MY. Influence of PI-3K/Akt pathway on Wnt signalling in regulating myeloid progenitor cell proliferation. Evidence for a role of autocrine/paracrine Wnt regulation. Br J Haematol 2009;146:637–51.
50. Howe LR, Watanabe O, Leonard J, Brown AM. Twist is up-regulated in response to Wnt1 and inhibits mouse mammary cell differentiation. Cancer Res 2003;63:1906–13.
51. Clement V, Sanchez P, de Tribolet N, Radovanovic I, Ruiz i Altaba A. HEDGEHOG-GLI1 signaling regulates human glioma growth, cancer stem cell self-renewal, and tumorigenicity. Curr Biol 2007;17:165–72.
52. Stevenson DA, Zhou H, Ashrafi S, Messiaen LM, Carey JC, D'Astous JL, et al. Double inactivation of NF1 in tibial pseudarthrosis. Am J Hum Genet 2006;79:143–8.



Supplementary Figure S1: **A simplified representation of the three different Wnt signalling pathways: the canonical pathway, the planar cell polarity pathway, and the Wnt/calcium pathway.** In the absence of Wnt ligand, the ''destruction complex'' composed of the core proteins Axin, adenomatous polyposis coli (APC), and glycogen synthase kinase-3 (GSK3) rapidly phosphorylates cytosolic beta-catenin, targeting it for subsequent proteasome-mediated destruction. Binding of Wnt to Frizzled (FZD) and low-density lipoprotein receptor-related protein 5/6 (LRP5/6) activates the cytosolic protein Dishevelled (DVL), leading to inhibition of the destruction complex. The resulting accumulated beta-catenin can then translocate to the nucleus to activate Wnt-responsive target genes regulated by lymphoid enhancer factor (LEF) and T cell factor (TCF) family transcription factors, leading to various cellular effects. The secreted inhibitor Dickkopf (DKK) can antagonize Wnt signalling by competitively binding to LRP5/6. Secreted FZD-related proteins (SFRPs) and Wnt inhibitory factor (WIF) are thought to antagonize Wnt signalling by sequestering Wnt ligand in the extracellular space. Binding of Wnt isoforms to FZD can trigger beta-catenin-independent downstream signalling events, other so-called non-canonical Wnt pathways that do not require the transcriptional activity of beta-catenin. One branch of non-canonical pathways involves the activation of RHO and RAC small G proteins to regulate the actin cytoskeleton. DVL-associated activator of morphogenesis 1 (DAAM1), when complexed with DVL and RHO, acts through the regulation of RHO-associated protein kinases (ROCK) and the DVL–RAC GTPase complex to affect actin remodelling. Another branch, when activated, is defined by a phospholipase C {PLC)-mediated increase in intracellular Ca^{2+} levels and Ca^{2+} fluxes that lead to the activation of Ca^{2+}/calmodulin-dependent protein kinase (CaMK), protein kinase C (PKC), and nuclear factor of activated T cells (NFAT).



Supplementary Figure S2: mRNA expression of *WNT9A*, *WNT5A*, *SFRP4* and *DKK1* in four tumor pairs (plexiform neurofibroma and matched MPNSTs from the same patient). For each gene, mRNA levels were normalized such that the median value of 7 dermal neurofibromas was 1.

Supplementary Table S1. Clinical and histological characteristics of the 16 patients with MPNSTs.

Patient Sex/Age (years)	Tumor localization	Tumor size (cm)	Histoprognostic grade
F/19	Lower limb	27	III
F/18	Upper limb	20	III
M/18	Head	15	III
M/35	Abdomen	20	III
M/34	Lumbar	6.5	III
M/53	Upper limb	13	III
F/24	Lumbar	7	I
M/24	Abdomen	20	III
M/31	Face	15	III
F/32	Abdomen	5	III
M/41	Abdomen	9	III
M/40	Abdomen	22	III
F/25	Buttock	12	III
M/38	Thigh	22	III
F/40	Arm	15	III
M/31	NA	NA	III

Plus sign indicates present; minus sign, absent; F, Female; M, male; NA: data not available

Supplementary Table S2. List of the 89 Wnt pathway selected genes.

Gene abbreviation	Gene alias	Gene definition	Chromosome location	Genbank number
Wnt ligands (n=19)				
WNT1	INT1	Wingless-type MMTV integration site family, member 1	12q13	NM_005430
WNT2		Wingless-type MMTV integration site family, member 2	7q31	NM_003391
WNT2B	WNT13	Wingless-type MMTV integration site family, member 2B	1p13	NM_004185
WNT3	INT4	Wingless-type MMTV integration site family, member 3	17q21	NM_030753
WNT3A		Wingless-type MMTV integration site family, member 3A	1q42	NM_033131
WNT4		Wingless-type MMTV integration site family, member 4	1p36.23-p35.1	NM_030761
WNT5A		Wingless-type MMTV integration site family, member 5A	3p21-p14	NM_003392
WNT5B		Wingless-type MMTV integration site family, member 5B	12p13.3	NM_030775
WNT6		Wingless-type MMTV integration site family, member 6	2q35	NM_006522
WNT7A		Wingless-type MMTV integration site family, member 7A	3p25	NM_004625
WNT7B		Wingless-type MMTV integration site family, member 7B	22q13	NM_058238
WNT8A		Wingless-type MMTV integration site family, member 8A	5q31	NM_031933
WNT8B		Wingless-type MMTV integration site family, member 8B	10q24	NM_03393
WNT9A	WNT14	Wingless-type MMTV integration site family, member 9A	1q42	NM_003395
WNT9B	WNT15	Wingless-type MMTV integration site family, member 9B	17q21	NM_003396
WNT10A		Wingless-type MMTV integration site family, member 10A	2q35	NM_025216
WNT10B	WNT12	Wingless-type MMTV integration site family, member 10B	12q13	NM_003394
WNT11		Wingless-type MMTV integration site family, member 11	11q13.5	NM_004626
WNT16		Wingless-type MMTV integration site family, member 16	7q31	NM_057168
Wnt receptors (n=13)				
FZD1		Frizzled homolog 1 (Drosophila)	7q21	NM_003505
FZD2		Frizzled homolog 2 (Drosophila)	17q21.1	NM_001466
FZD3		Frizzled homolog 3 (Drosophila)	8p21	NM_017412
FZD4		Frizzled homolog 4 (Drosophila)	11q14.2	NM_012193
FZD5		Frizzled homolog 5 (Drosophila)	2q33-q23.1	NM_003468
FZD6		Frizzled homolog 6 (Drosophila)	8q22.3-q23.1	NM_003506
FZD7		Frizzled homolog 7 (Drosophila)	2q33	NM_003507
FZD8		Frizzled homolog 8 (Drosophila)	10p11.21	NM_031866
FZD9		Frizzled homolog 9 (Drosophila)	7q11.23	NM_003508
FZD10		Frizzled homolog 10 (Drosophila)	12q24.33	NM_007197
LRP5		Low density lipoprotein receptor-related protein 5	11q13.4	NM_002335
LRP6		Low density lipoprotein receptor-related protein 6	12p11-p13	NM_002336
ROR1		Receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 1	1p32-p31	NM_005012
Wnt signal transduction (n=32)				
ANKRD6	Diversin	Ankyrin repeat domain 6	6q14.2-q16.1	NM_014942
APC		Adenomatosis polyposis coli	5q21-q22	NM_000038
AXIN1		Axin 1 (conductin, axil)	16p13.3	NM_003502
AXIN2		Axin 2 (conductin, axil)	17q23-q24	NM_004655
AXUD1	URAX1	AXIN1 up-regulated 1	3p22	NM_033027
BCL9L	BCL9-2	B-cell CLL/lymphoma 9-like	11q23.3	NM_182557
DACT1		Dapper homolog 1, antagonist of beta-catenin (xenopus)	14q23.1	NM_016651
DACT2		Dapper homolog 2, antagonist of beta-catenin (xenopus)	6q27	NM_224462
DKK1		Dickkopf homolog 1 (Xenopus laevis)	10q11.2	NM_012242
DKK2		Dickkopf homolog 2 (Xenopus laevis)	4q25	NM_014421
DKK3		Dickkopf homolog 3 (Xenopus laevis)	11p15.2	NM_015881
DKK4		Dickkopf homolog 4 (Xenopus laevis)	8p11.2-p11.1	NM_014420
DVL1		Dishevelled, dsh homolog 1	1p36	NM_004421
DVL2		Dishevelled, dsh homolog 2	17p13.2	NM_004422
DVL3		Dishevelled, dsh homolog 3	3q27	NM_004423

FRZB	FRITZ	Frizzled-related protein	2qter	NM_001463
GSK3B		Glycogen synthase kinase 3 beta	3q13.3	NM_002093
KREMEN1	KRM1	Kringle containing transmembrane protein 1	22q12.1	NM_032045
KREMEN2	KRM2	Kringle containing transmembrane protein 2	16p13.3	NM_172229
NKD1		Naked cuticle homolog 1 (Drosophilia)	16q12	NM_033119
NKD2		Naked cuticle homolog 2 (Drosophilia)	5p15.3	NM_033120
PYGO1	Pygopus 1	Pygopus homolog 1 (Drosophilia)	15q21.1	NM_015617
PYGO2	Pygopus 2	Pygopus homolog 2 (Drosophilia)	1q22	NM_138300
SFRP1	FRP-1, SARP2	Secreted frizzled-related protein 1	8p12-11.1	NM_003012
SFRP2	FRP-2, SARP1	Secreted frizzled-related protein 2	4q31.3	NM_003013
SFRP4	FRP-4	Secreted frizzled-related protein 4	7p14.1	NM_003014
SFRP5	SARP3	Secreted frizzled-related protein 5	10q24.1	NM_003015
TLE1	ESG1	Transducin-like enhancer of split 1 (E (sp1) homolog, Drosophilia)	9q21.32	NM_005077
TLE2	ESG2	Transducin-like enhancer of split 2 (E (sp1) homolog, Drosophilia)	19p13.3	NM_003260
TLE3	ESG3	Transducin-like enhancer of split 3 (E (sp1) homolog, Drosophilia)	15q22	NM_005078
TLE4	ESG4	Transducin-like enhancer of split 4 (E (sp1) homolog, Drosophilia)	9q21.31	NM_007005
WIF1		Wnt inhibitory factor 1	12q14.3	NM_007191
Wnt transcriptional factors (n=4)				
LEF1	TCF1alpha	Lymphoid enhancer-binding factor 1	4q23-q25	NM_016269
TCF7	TCF1	Transcription factor 7	5q31.1	NM_003202
TCF7L1	TCF3	Transcription factor 7-like 1	2p11.2	NM_031283
TCF7L2	TCF4	Transcription factor 7-like 2	10q25.3	NM_030756
Lef/Tcf-inducible proteins (n=10)				
BMP2		Bone morphogenetic protein 2	20p12	NM_001200
BMP4		Bone morphogenetic protein 4	14q22-q23	NM_001202
EPHB2		EPH receptor B2	1p36.1-p35	NM_004442
EPHB3		EPH receptor B3	3q21-qter	NM_004443
ID2		Inhibitor of DNA binding 2	2p25	NM_002166
MSX2		Msh homeo box homolog 2 (Drosophilia)	5q34-q35	NM_002449
MYC		Myelocytomatosis viral oncogene homolog	8q24.21	NM_002467
SOX9		SRY (sex determining region Y)-box 9	17q27	NM_000346
TWIST1		Twist homolog 1	7p21.2	NM_000474
WISP1		WNT1 inducible signaling pathway protein 1	8q24.1-q24.3	NM_003882
Non canonical Wnt signal : planar cell polarity pathway (n=4)				
DAAM1		Dishevelled associated activator of morphogenesis 1	14q23.1	NM_014992
ROCK1		Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase 1	18q11.1	NM_005406
ROCK2		Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase 2	2p24	NM_004850
VANGL1		Vang-like 1	1p13.1	NM_138959
Non canonical Wnt signal : Wnt/calcium pathway (n=7)				
CALM1		calmodulin 1	14q24-q31	NM_006888
CAMK2B		calcium/calmodulin-dependent protein kinase II beta	7p14.3-p14.1	NM_001220
NFATC1		nuclear factor of activated T-cells, calcineurin-dependent 1	18q23	NM_006162
OCM		oncomodulin	7p22.1	NM_001097622
PRKCD		protein kinase C, delta	3p21.31	NM_006254
PRKCQ		protein kinase C, theta	10p15	NM_006257
SIAH2		seven in absentia homolog 2	3q25	NM_002467

Supplementary Table S3. mRNA levels of 89 Wnt pathway genes in seven dermal neurofibromas, seven plexiform neurofibromas, and eight MPNSTs.

	Dermal Neurofibromas (n=7)			Plexiform Neurofibromas (n=7)			MPNSTs (n=8)		
	Median	**Min**	**Max**	**Median**	**Min**	**Max**	**Median**	**Min**	**Max**
Wnt ligands (n=19)									
WNT1	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
WNT2	1.00	0.61	3.15	1.00	0.19	3.28	**0.20**	0.00	1.19
WNT2B	1.00	0.77	2.42	1.78	1.17	4.11	0.54	0.12	4.38
WNT3	1.00	0.48	11.74	1.74	0.28	8.47	**3.68**	1.03	18.68
WNT3A	1.00	0.00	2.30	0.76	0.00	2.76	1.55	0.27	6.02
WNT4	1.00	0.24	10.02	0.96	0.00	11.10	0.51	0.02	0.59
WNT5A	1.00	0.29	1.77	0.73	0.22	3.43	**15.41**	1.61	40.62
WNT5B	1.00	0.61	1.41	0.89	0.65	1.73	1.04	0.25	2.02
WNT6	1.00	0.29	2.30	0.75	0.22	1.79	0.57	0.00	0.99
WNT7A	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
WNT7B	1.00	0.90	2.42	0.72	0.00	93.52	**0.27**	0.00	52.56
WNT8A	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
WNT8B	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
WNT9A	1.00	0.51	1.36	1.29	0.95	2.73	**0.25**	0.09	1.25
WNT9B	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
WNT10A	1.00	0.25	2.59	1.07	0.11	2.19	0.55	0.05	3.34
WNT10B	1.00	0.26	4.65	**2.44**	1.04	3.86	**4.09**	0.16	20.08
WNT11	1.00	0.38	2.47	0.80	0.11	4.02	**2.19**	0.48	6.12
WNT16	1.00	0.26	35.32	0.52	0.07	6.52	**2.09**	0.45	5.58
Wnt receptors (n=13)									
FZD1	1.00	0.50	2.14	0.64	0.00	3.24	**4.11**	1.03	6.32
FZD10	1.00	0.29	1.90	0.94	0.50	1.38	0.55	0.26	2.16
FZD2	1.00	0.35	1.76	0.69	0.27	5.70	0.95	0.38	3.26
FZD3	1.00	0.73	1.12	0.67	0.41	2.84	1.09	0.32	2.17
FZD4	1.00	0.52	1.68	1.00	0.49	2.25	0.53	0.13	1.71
FZD5	1.00	0.41	2.36	0.69	0.54	1.65	**4.26**	0.88	14.04
FZD6	1.00	0.86	1.36	1.46	0.97	4.25	1.89	0.67	3.65
FZD7	1.00	0.51	1.67	0.90	0.39	1.85	0.77	0.19	6.38
FZD8	1.00	0.28	1.73	0.68	0.38	1.18	**6.17**	1.35	16.91
FZD9	1.00	0.32	1.93	1.50	0.67	4.55	1.32	0.11	14.86
LRP5	1.00	0.95	1.21	1.06	0.87	2.33	0.94	0.01	4.53
LRP6	1.00	0.86	1.16	0.95	0.72	3.10	0.83	0.31	1.55
ROR2	1.00	0.70	1.38	0.93	0.35	1.61	**2.33**	0.50	7.30
Wnt signal transduction (n=32)									
ANKRD6	1.00	0.68	1.57	1.14	0.75	2.38	0.64	0.26	2.36
APC	1.00	0.63	1.66	1.14	0.61	1.57	1.43	0.71	2.35
AXIN1	1.00	0.88	1.24	1.09	0.53	3.53	0.77	0.36	2.15
AXIN2	1.00	0.54	1.41	0.98	0.77	1.75	0.90	0.20	1.21
AXUD1	1.00	0.50	1.47	1.75	0.93	4.97	0.92	0.40	8.87
BCL9L	1.00	0.87	1.99	1.18	0.89	2.48	0.61	0.15	2.41
DACT1	1.00	0.87	1.61	1.49	0.37	4.85	1.03	0.22	3.14
DACT2	1.00	0.10	2.05	1.02	0.00	2.14	1.12	0.09	7.53
DKK1	1.00	0.35	6.62	**2.03**	0.38	5.41	**70.13**	5.26	306.53
DKK2	1.00	0.68	2.54	0.51	0.01	1.51	0.67	0.13	1.02
DKK3	1.00	0.57	1.69	**0.49**	0.30	4.10	**0.17**	0.02	1.38
DKK4	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE

DVL1	1.00	0.74	1.41	1.25	0.67	2.58	1.05	0.12	1.56
DVL2	1.00	0.85	1.51	1.28	0.88	3.79	0.92	0.28	2.59
DVL3	1.00	0.81	1.51	1.25	0.81	2.48	1.34	0.59	3.51
FRZB	1.00	0.36	2.24	0.83	0.45	11.34	0.59	0.07	1.48
GSK3B	1.00	0.36	2.12	0.50	0.36	0.96	1.10	0.55	2.63
KREMEN1	1.00	0.66	1.60	1.08	0.39	1.28	**0.28**	0.08	0.71
KREMEN2	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
NKD1	1.00	0.58	2.21	0.74	0.38	1.39	0.75	0.25	3.01
NKD2	1.00	0.44	2.85	1.04	0.09	1.25	1.93	0.56	4.42
PYGO1	1.00	0.35	1.23	0.90	0.77	2.50	1.49	1.00	3.02
PYGO2	1.00	0.42	2.05	0.90	0.50	1.53	1.14	0.50	6.24
SFRP1	1.00	0.44	1.95	0.54	0.12	1.26	**0.31**	0.05	0.59
SFRP2	1.00	0.23	3.30	1.11	0.02	4.52	1.85	0.60	3.92
SFRP4	1.00	0.21	2.86	**2.19**	0.95	7.27	0.77	0.22	2.61
SFRP5	1.00	0.34	2.98	1.38	0.12	16.25	**2.11**	0.05	33.97
TLE1	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
TLE2	1.00	0.85	1.66	1.91	0.82	2.77	**2.24**	0.40	5.79
TLE3	1.00	0.73	1.24	0.63	0.28	2.00	0.69	0.34	1.52
TLE4	1.00	0.64	1.40	1.63	0.40	2.53	1.68	0.41	3.57
WIF1	1.00	0.57	9.82	**0.23**	0.00	60.90	**150.42**	17.27	717.83
Wnt transcriptional factors (n=4)									
LEF1	1.00	0.53	1.50	0.94	0.42	5.05	**2.04**	0.21	9.95
TCF7	1.00	0.56	1.63	0.52	0.25	3.22	**0.30**	0.06	0.69
TCFL1	1.00	0.71	1.62	1.16	0.78	2.35	0.92	0.28	2.48
TCFL2	1.00	0.82	1.15	1.17	0.69	2.51	0.66	0.35	2.18
Lef/Tcf-inducible proteins (n=10)									
BMP4	1.00	0.40	1.90	0.82	0.47	1.43	0.66	0.20	1.09
EPHB3	1.00	0.14	4.87	**0.14**	0.00	3.81	**3.26**	0.86	22.35
ID2	1.00	0.02	1.98	**0.11**	0.01	1.40	**2.75**	0.50	9.24
MSX2	1.00	0.49	1.36	1.05	0.36	1.57	**4.66**	1.63	30.37
MYC	1.00	0.18	2.22	**2.32**	1.79	91.13	1.37	0.26	7.72
SOX9	1.00	0.06	1.84	0.53	0.06	4.01	**3.16**	0.25	13.11
WISP1	1.00	0.22	6.95	1.03	0.67	1.83	**58.81**	29.97	213.73
TWIST1	1.00	0.84	2.48	1.15	0.28	2.87	**4.05**	0.47	8.36
BMP2	1.00	0.44	1.18	0.71	0.21	1.29	**2.16**	0.52	8.67
EPHB2	1.00	0.34	1.65	1.18	0.71	5.22	1.76	0.67	5.66
Non canonical Wnt signal: planar cell polarity pathway (n=4)									
DAAM1	1.00	0.78	1.25	0.58	0.09	1.43	0.52	0.12	0.88
ROCK1	1.00	0.53	1.45	0.86	0.55	1.74	0.56	0.35	1.06
ROCK2	1.00	0.03	2.83	1.67	1.46	2.03	1.42	0.80	2.62
VANGL1	1.00	0.73	1.42	0.97	0.75	1.61	0.97	0.41	2.61
Non canonical Wnt signal: Wnt/calcium pathway (n=7)									
CALM1	1.00	0.84	1.49	0.79	0.63	1.17	0.59	0.18	1.29
CAMK2B	1.00	0.13	26.65	**13.60**	0.00	541.64	**195.66**	58.87	714.83
NFACT1	1.00	0.81	1.17	0.91	0.66	1.52	0.79	0.41	1.75
OCM	1.00	0.47	1.43	1.17	0.51	1.82	0.53	0.04	1.59
PRKCD	1.00	0.72	1.64	1.18	0.75	2.41	0.79	0.28	2.65
PRKCQ	1.00	0.40	1.39	1.45	0.58	4.70	**3.53**	1.62	6.93
SIAH2	1.00	0.83	1.09	0.94	0.64	1.47	1.31	0.62	4.54

Abbreviations: Min, minimum value; Max, maximum value; NE, not expressed.
The genes indicated in bold were found to be differentially expressed (>2-fold).

Supplementary Table S4. mRNA levels of 32 identified genes in 10 dermal neurofibromas, 31 plexiform neurofibromas, and 16 MPNSTs.

	Dermal Neurofibromas (n=10)			**Plexiform Neurofibromas (n=31)**				**MPNSTs (n=16)**			
	Median	Min	Max	**Median**	Min	Max	P^a	**Median**	Min	Max	P^b
Wnt ligands (n=9)											
WNT2	1.00	0.26	3.20	0.96	0.04	11.71	NS	**0.25**	0.00	1.17	**0.0009**
WNT3	1.00	0.00	8.32	1.05	0.00	11.33	NS	2.49	0.00	10.44	NS
WNT5A	1.00	0.22	1.36	1.14	0.07	8.22	NS	**6.79**	0.00	45.38	**0.007**
WNT7B	1.00	0.00	428.09	0.23	0.00	125.02	NS	0.11	0.00	24.8	NS
WNT9A	1.00	0.66	2.12	**1.98**	0.31	22.39	**0.005**	**0.31**	0.08	2.66	**0.008**
WNT10B	1.00	0.00	2.46	1.42	0.23	6.15	NS	1.66	0.00	9.94	NS
WNT11	1.00	0.00	2.51	1.33	0.10	71.35	NS	1.27	0.08	11.26	NS
WNT16	1.00	0.00	28.93	0.61	0.00	34.68	NS	0.74	0.07	58.56	NS
Wnt receptors (n=4)											
FZD1	1.00	0.71	2.12	**1.89**	0.00	13.12	**0.04**	**4.39**	1.20	11.94	**0.0006**
FZD5	1.00	0.41	2.55	1.16	0.51	13.23	NS	2.15	0.00	114.02	NS
FZD8	1.00	0.28	1.89	1.21	0.26	15.79	NS	**5.86**	1.35	85.03	**0.00004**
ROR2	1.00	0.36	1.99	0.86	0.11	4.74	NS	1.47	0.00	10.15	NS
Wnt signal transduction (n=8)											
DKK1	1.00	0.00	10.26	1.70	0.00	17.64	NS	**46.76**	4.21	305.57	**0.00006**
DKK3	1.00	0.58	2.23	0.84	0.20	5.33	NS	**0.31**	0.03	1.76	**0.002**
KREMEN1	1.00	0.54	3.13	0.67	0.19	5.20	NS	**0.17**	0.09	0.68	**0.00004**
SFRP1	1.00	0.40	2.14	**0.45**	0.13	2.54	**0.01**	**0.34**	0.04	1.93	**0.007**
SFRP4	1.00	0.16	1.63	**1.48**	0.07	18.25	**0.04**	0.43	0.01	2.05	NS
SFRP5	1.00	0.38	4.50	**7.20**	0.02	203.95	**0.02**	3.19	0.00	40.57	NS
TLE2	1.00	0.38	1.57	**2.02**	0.50	11.56	**0.002**	1.39	0.32	4.32	NS
WIF1	1.00	0.00	139.29	2.03	0.00	452.50	NS	**513.47**	0.00	6424.38	**0.0009**
Wnt transcriptional factors (n=2)											
LEF1	1.00	0.33	1.83	1.20	0.00	11.07	NS	**2.49**	0.18	9.15	**0.004**
TCF7	1.00	0.57	1.66	0.68	0.21	5.29	NS	**0.26**	0.00	3.65	**0.009**
Lef/Tcf-inducible proteins (n=8)											
EPHB3	1.00	0.46	4.00	0.96	0.29	3.33	NS	1.42	0.07	6.03	NS
ID2	1.00	0.02	2.21	0.39	0.00	11.73	NS	**2.11**	0.56	10.29	**0.03**
MSX2	1.00	0.42	2.96	0.83	0.24	24.50	NS	**4.51**	0.04	32.95	**0.04**
MYC	1.00	0.44	4.34	**1.87**	0.59	362.94	**0.005**	1.01	0.17	6.01	NS
SOX9	1.00	0.34	3.13	1.62	0.11	14.75	NS	**3.14**	0.07	21.67	**0.005**
WISP1	1.00	0.17	6.68	1.46	0.00	20.53	NS	**29.30**	0.00	205.53	**0.004**
TWIST1	1.00	0.30	1.96	0.67	0.21	5.02	NS	**1.64**	0.26	9.72	**0.005**
BMP2	1.00	0.37	5.04	1.40	0.00	9.92	NS	**1.79**	0.25	35.55	**0.03**
Non canonical Wnt signal: Wnt/calcium pathway (n=2)											
CAMK2B	1.00	0.00	5.82	**6.01**	0.00	157.80	**0.0003**	**44.84**	0.99	219.23	**0.00006**
PRKCQ	1.00	0.00	5.28	**2.87**	0.40	23.32	**0.04**	**4.69**	0.00	13.52	**0.01**
Other tested genes											
NF1	1.00	0.34	1.81	1.12	0.00	2.92	NS	1.14	0.38	2.26	NS
MKI67	1.00	0.00	6.61	1.26	0.00	5.42	NS	**30.50**	1.35	146.66	**0.00005**

Abbreviations: Min, minimum value; Max, maximum value; NS, not significant.

[a]Mann-Whitney U test: plexiform neurofibromas versus dermal neurofibromas.

[b]Mann-Whitney U test: MPNSTs versus dermal neurofibromas.

The genes indicated in bold were found to be significantly differentially expressed.

Supplementary Table S5. mRNA expression of 24 identified genes in four sporadic MPNSTs.

	SPOMPNST1	SPOMPNST2	SPOMPNST3	SPOMPNST4
WNT2	2.10	0.20	0	0.1
WNT5A	1.60	1.20	12.30	0.70
WNT9A	0.02	0.03	0.10	0.04
FZD1	1.85	5.13	0.11	0.88
FZD8	0.08	4.00	0.21	0.10
DKK1	11.89	11.02	0.01	2.23
DKK3	0.33	0.44	0.04	0.04
KREMEN1	0.24	1.05	0.09	0.18
SFRP1	0.27	0.72	0.02	0.93
SFRP4	0.30	2.77	0.28	0.26
SFRP5	0.01	0.14	0.02	0
TLE2	1.22	10.36	0.11	1.48
WIF1	0.12	15.21	4.98	1.15
LEF1	3.11	4.59	2.83	0.56
TCF7	0.02	0.06	0.05	0.01
ID2	2.1	7.7	1.3	0.6
MSX2	0.2	1.0	0.4	0.1
MYC	0.8	6.1	1.3	0.9
SOX9	1.18	3.68	0.45	0.44
WISP1	ND	ND	ND	ND
TWIST1	31.55	130.24	0.07	0.03
BMP2	49.82	292.48	0.16	0.32
CAMK2B	0.01	0.04	0	0.01
PRKCQ	4.41	9.35	0.16	6.15

[a]For each gene, mRNA levels were normalized to the 10 dermal neurofibromas.
ND: not determined

I-4. Discussion

Dans cette étude, nous avons appréhendé le rôle de la voie WNT dans la tumorigenèse NF1 et plus particulièrement son lien avec le réservoir de CSC et la transition Schawnno-méchymale.
Peu après la parution de cet article, plusieurs autres travaux ont rapporté l'importance de la voie WNT/β-caténine dans les tumeurs NF1 (Watson *et al.* 2013; Mo *et al.* 2013.).

I-4.1. Preuves additionnelles de l'activation de la voie WNT dans les MPNST par perte de fonction des membres du complexe de destruction AXIN ou par surexpression des ligands

Les groupes de David Largaespada et Nancy Ratner ont utilisé une approche sans à priori de criblage basé sur *Sleeping Beauty*, dont nous avons déjà parlé en introduction, pour identifier les voies de signalisation critiques pour la tumorigenèse des MPSNT (Rahrmann *et al.* 2013). L'analyse des voies de signalisation, faisant intervenir les gènes dans lesquels surviennent des évènements d'insertions de transposons, a révélé un enrichissement significatif des gènes de la voie WNT (Watson *et al.* 2013). L'activation de la voie WNT a été confirmée dans des modèles murins développant des neurofibromes et des MPNST. Des données additionnelles d'analyse d'expression de MPNST humains montrent une diminution d'expression des membres du complexe de destruction AXIN ou une surexpression des ligands *RSPO* et *FZD* potentialisant la voie. Watson *et al.* observent l'augmentation de la localisation nucléaire de la β-caténine avec le grade de malignité des tumeurs et confirment l'activation de la transcription des gènes cibles en aval dans les MPNST. Grâce à diverses manipulations géniques, ils montrent qu'*in vitro* l'induction de la voie WNT est suffisante pour conférer aux cellules de Schwann humaines immortalisées des caractéristiques de cellules transformées. A l'inverse, l'inactivation de cette voie est suffisante pour réduire le phénotype tumorigène des lignées cellulaires issues de MPNST NF1 humains. Ces données d'expression corrèlent avec un rôle oncogène de la voie WNT/β-caténine et suppresseur de tumeurs du complexe AXIN dans les MPNST. En revanche, l'activation de la voie WNT est nécessaire mais pas suffisante pour la transformation et la croissance des MPNST murines *in vivo*. La coopération d'autres mutations semble être cruciale dans le développement et la progression des MPNST.

I-4.2. Mise en évidence de la présence d'un transcrit de fusion impliquant *RSPO* pour activer la voie WNT dans les MPNST

Watson *et al.* ont retrouvé dans une lignée cellulaire de MPNST que nous avons aussi testé, un transcrit de fusion, impliquant *RSPO2,* comme celui décrit dans les cancers du colon (Seshagiri *et al.* 2012). Des études additionnelles sont nécessaires pour savoir si la présence de tels transcrits de fusion est un événement aussi fréquent qu'il l'est dans les cancers du colon et si le gène *RSPO2* est toujours fusionné au même gène. Les auteurs suggèrent que RSPO2 peut être une nouvelle cible thérapeutique potentielle pour inhiber la voie WNT. Le transcrit de fusion pourrait également être un bio-marqueur de réponse à certains traitements.

I-4.3. Autres mécanismes potentiels d'activation de la voie WNT/β-caténine dans les MPNST

La recherche de mutations des gènes *APC*, *AXIN1*, *AXIN2* et *CTNNB1*, par une analyse cBioPortal ne retrouve aucune mutation de ces gènes dans la cohorte de MPNST disponible. En dehors du mécanisme d'activation de la voie WNT par génération d'un transcrit de fusion, d'autres mécanismes plus complexes et indirects, pouvant impliquer les voies de signalisation de la neurofibromine, pourraient donc expliquer l'activation de la voie WNT/β-caténine dans les MPNST (Figure 41).

- L'activation d'AKT, observée dans les MPNST, conduit à la phosphorylation et l'inactivation de GSK3β. L'inactivation de GSK3β, membre du complexe de destruction AXIN, résulte en la stabilisation de la β-caténine (Gehrke *et al.* 2009 ; Persad *et al.* 2001).

- Plusieurs études indiquent que l'activation de divers récepteurs tyrosine-kinase (RTK) (comme EGFR, ERBB2, MET) peut activer la voie WNT/β-caténine dans des processus de tumorigenèse. Des cascades de signalisation différentes ont été décrites : par exemple, dans le cancer de la prostate, la surexpression d'EGFR induit l'accumulation de la β-caténine par l'inactivation de GSK3β *via* la voie PI3K/AKT. Dans d'autres modèles, la stimulation chronique par l'EGF de l'EGFR peut activer la transcription β-caténine/TCF/LEF-dépendante indépendamment de l'inhibition de GSK3β (Hu *et al.* 2010 pour revue). De plus, l'utilisation du Glivec®, un inhibiteur de tyrosine kinase, entraine une baisse d'activité de la voie WNT/β-caténine et

diminue la prolifération cellulaire (Zhou *et al.* 2003). La surexpression d'EGFR est fréquente dans les MPNST et pourrait donc être à l'origine d'une activation de la voie WNT/β-caténine (Ling *et al.* 2005).

- Enfin, récemment, Mo *et al.* ont identifié un nouveau mécanisme de progression des MPNST dans lequel l'activation autocrine de CXCR4 (*C-X-C motif Chemokine Receptor 4*) par CXCL12 (*C-X-C motif Chemokine Ligand 12*) a pour conséquence l'activation de la signalisation de PI3K/AKT qui conduit à l'inactivation de GSK3β (Mo *et al.* 2013). La β-caténine, alors stabilisée, favorise *in fine* la transition de la phase G1 à la phase S du cycle cellulaire dans les cellules de MPNST.

Ces interactions entre divers signaux distincts à la membrane plasmique et les effets oncogèniques sur le programme transcriptionnel dans le noyau, sont encore difficiles à modéliser. La compréhension de ces interactions est pourtant critique pour le design de combinaisons rationnelles de thérapies.

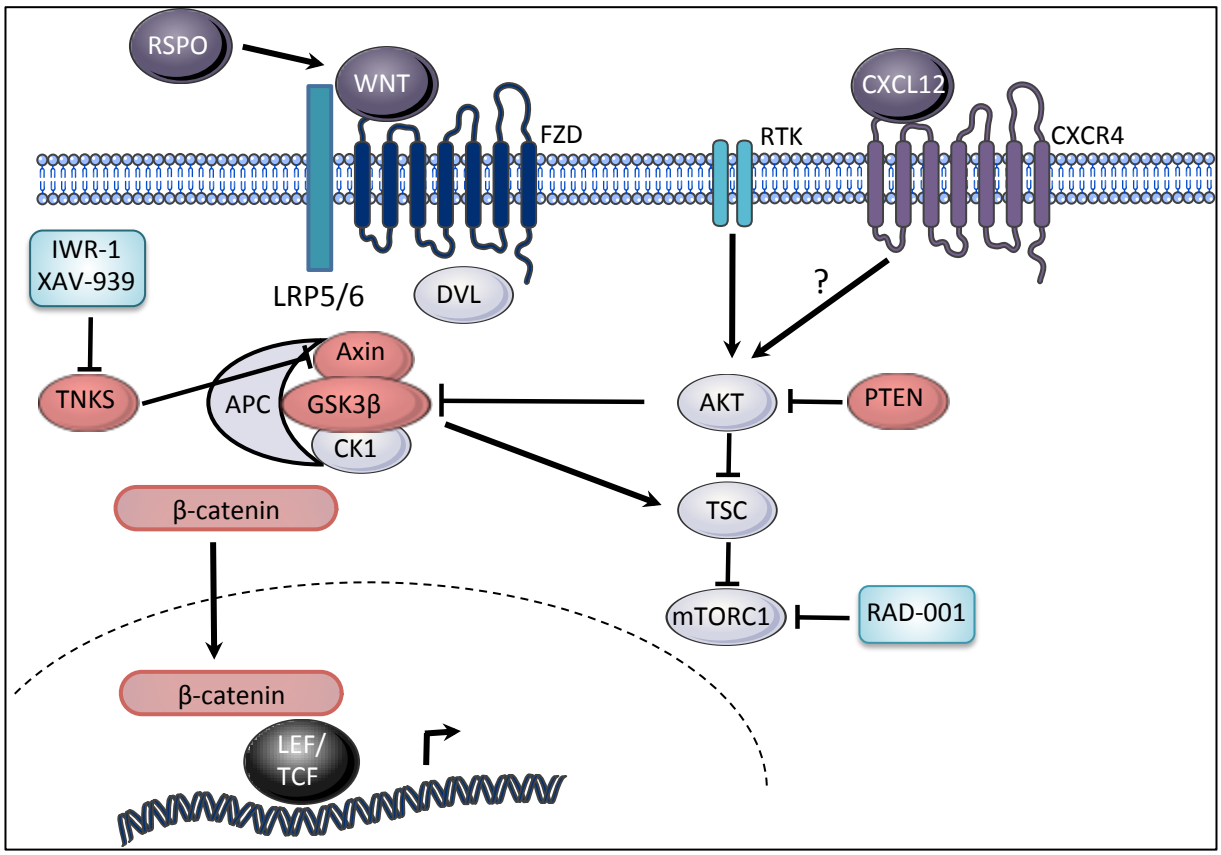


Figure 41. Interaction entre la voie WNT/β-caténine et d'autres voies de signalisation impliquées dans la tumorigenèse des MPNST.
Les gènes identifiés comme site d'insertion fréquent dans le screen *Sleeping Beauty* de Rahrmann *et al.* sont représentés en rouge. Les inhibiteurs utilisés dans cette même étude sont également représentés. Il s'agit de deux inhibiteurs de TNKS (*TaNKyraSe*), qui stabilisent l'AXIN en inhibant les enzymes TKNS, associés à un inhibiteur de mTORC1. D'après Reilly *et al.* 2013.

I-4.4. L'activation de la voie WNT, comme marqueur de malignité

Bien que l'activation de la voie WNT/β-caténine ne soit pas suffisante pour induire la transformation, elle peut être un marqueur très utile de progression de la tumeur en MPNST. Comme dans notre étude, Watson *et al.* et Mo *et al.* décrivent un marquage fort de la β-caténine nucléaire dans les MPNST comparé aux neurofibromes plexiformes et cutanés. Des études additionnelles sont nécessaires pour savoir si, comme dans les gliomes, la localisation nucléaire de la β-caténine pourrait être proposée comme marqueur de gravité et d'agressivité de la MPNST. Comme certains neurofibromes plexiformes de l'étude de Watson *et al.* présentent un marquage nucléaire de la β-caténine, il serait intéressant de savoir si ces MPNST ont une propension plus importante à se transformer en MPNST.

I-4.5. Cibler la voie WNT pour ralentir la progression tumorale

Divers inhibiteurs de la voie WNT ont été testés en cancérologie et font l'objet d'essais cliniques. (Kahn *et al.* 2014) (Figure 42).

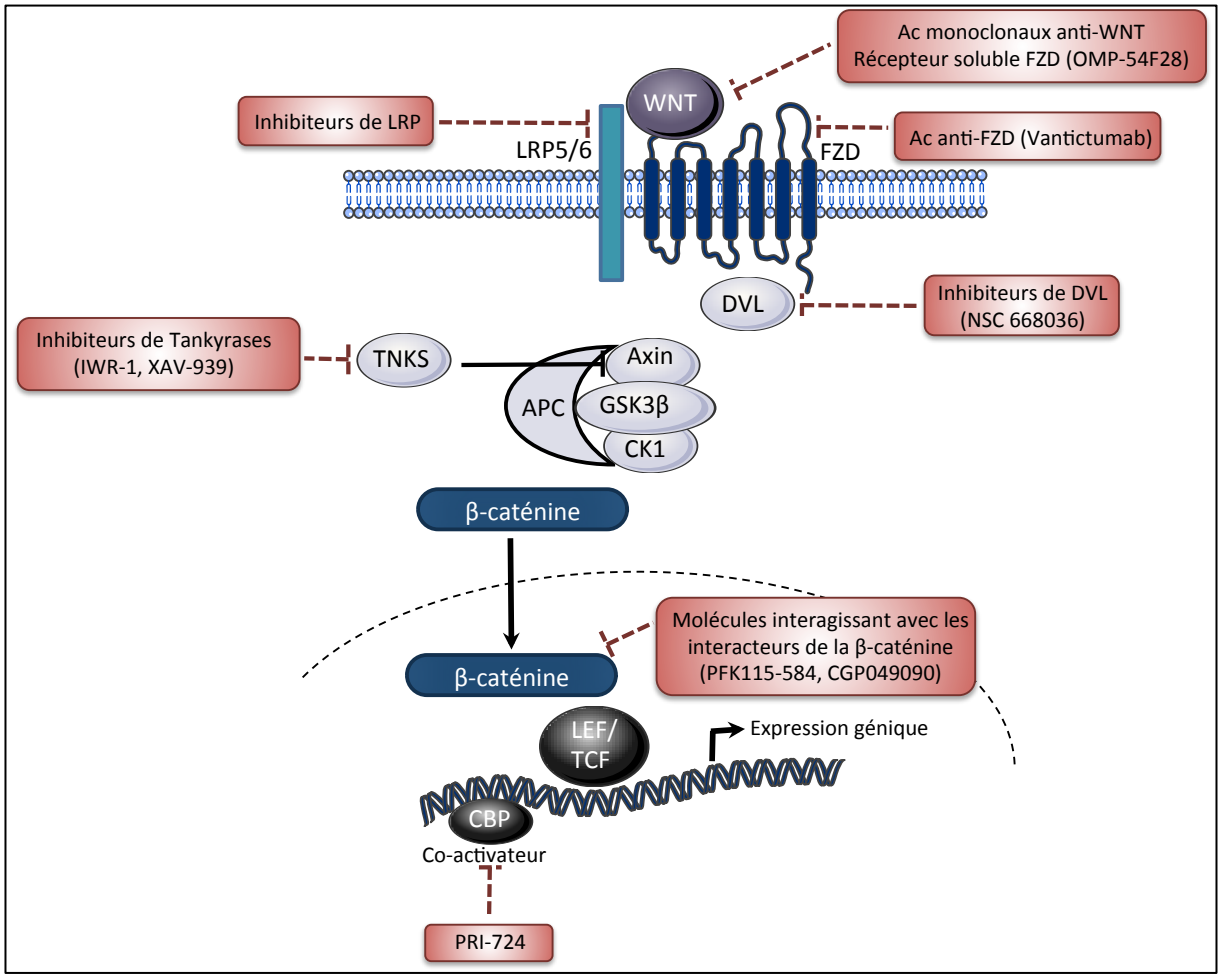


Figure 42. Schéma de la voie canonique WNT/β-caténine et des inhibiteurs pharmacologiques en développement dans le cancer.
Des anticorps monoclonaux anti-WNT, des récepteurs solubles FZD, des inhibiteurs de LRP, des anticorps anti-FZD, des inhibiteurs de DVL, des inhibiteurs de tankyrases, des molécules interagissant avec les interacteurs de la β-caténine et un agent dissociant le complexe β-caténine/CBP (*CREB-Binding Protein*) sont à l'étude pour contrer l'activation aberrante de WNT dans les cancers.

Le ciblage de la voie WNT, qui joue un rôle dans le développement et la progression de nombreux cancers, semble être une solution thérapeutique prometteuse. Watson *et al.* mettent en évidence *in vitro* une action cytostatique d'inhibiteurs de TNKS (IWR-1 et XAV-939). Le traitement par ces inhibiteurs montre un effet synergique cytotoxique avec l'ajout d'un inhibiteur de mTORC1 (RAD-001) (Figure 42). Des études supplémentaires *in vivo* seront nécessaires pour confirmer ces résultats encourageants.

II- APPROCHE 2.

II-1.1. Mise en évidence de l'inactivation génétique du PRC2 au cours de la tumorigenèse NF1.

Article 2:

De Raedt T, Beert E, Pasmant E, **Luscan A**, Brems H, Ortonne N, Helin K, Hornick JL, Mautner V, Kehrer-Sawatzki H, Clapp W, Bradner J, Vidaud M, Upadhyaya M, Legius E, Cichowski K. PRC2 loss amplifies Ras-driven transcription and confers sensitivity to BRD4-based therapies. *Nature.* 2014;514:247-51. (Article en Annexe 3)

II-1.2. Objectif de l'étude

Etudier l'implication de *SUZ12* dans le risque accru de survenu des MPNST chez les patients NF1 délétés et, plus généralement, savoir si l'inactivation du PRC2 joue un rôle dans la tumorigenèse NF1.

II-1.3. Design de l'expérience

Mon travail a consisté en différentes approches génomiques au sein d'un panel de 51 MPNST, constitué dans le cadre d'une collaboration internationale, à la recherche d'altérations de *SUZ12* et plus généralement du PRC2. Ainsi, chaque MPNST a été analysée en CGH-*array* et par un séquençage NGS ciblé sur la plateforme mixte APHP-INSERM située dans le service de Biochimie et Génétique Moléculaire de l'hôpital Cochin. Les travaux que j'ai réalisés personnellement sont détaillés ici. L'article est disponible en Annexe 3.

II-1.4. Matériels et méthodes

Echantillons tumoraux de MPNST

Un panel de 51 MPNST provenant de 51 patients NF1 a été constitué dans le cadre d'une collaboration internationale. Vingt-et-une tumeurs étaient des MPNST de patients NF1 de la

cohorte française (Pr. K. Leroy, responsable Tumorothèque, Département d'Anatomo-Pathologie, hôpital Henri Mondor, AP-HP, Créteil). Vingt-trois MPNST provenaient de la cohorte belge (Department of Human Genetics, University Hospitals Leuven, Pr. Eric Legius) et sept MPNST provenaient de la cohorte galloise (Institute of Medical Genetics, Cardiff University, Pr. Meena Upadhyaya).

Extraction ADN

Les ADN ont été extraits selon la technique classique au phénol-chloroforme (Maniatis *et al.* 1989).

CGH-array

La recherche de grands remaniements somatiques dans la série de 51 MPNST a été conduite par l'analyse de l'ADN tumoral par puces CGH-*array* pangénomique de format 244K et 400K (Agilent® Technologies) comparativement à un pool d'ADN constitutionnels normaux qui a été utilisé comme ADN contrôle (plateforme de CGH-*array* de l'hôpital Saint-Louis. Brièvement, les ADN ont subi une digestion enzymatique avant d'être marqués spécifiquement par des fluorochromes différents (respectivement, la cyanine 3-dUTP et la cyanine 5-dUTP). Les ADN tumoraux et les ADN contrôles ont ensuite été co-hybridés sur la puce. L'analyse du rapport des intensités de fluorescences au niveau de chaque sonde a alors permis d'apprécier les variations de nombres de copies spécifiquement acquises dans les tumeurs. Cette analyse a été effectuée sur le logiciel CytoGenomics d' Agilent® Technologies.

Séquençage NGS ciblé

Le séquençage NGS de 14 gènes impliqués dans la méthylation d'H3K27 (*EZH1, EZH2, EED, SUZ12, JARID2, PCL1, PCL2, PCL3, AEBP2, KDM6A, SIRT1, HDAC2, RBBP4* et *RBBP7*) a été réalisé sur la plateforme de NGS du service de Biochimie et Génétique Moléculaire de l'hôpital Cochin. Les gènes de ce panel ont été choisis pour leur rôle direct ou indirect dans l'établissement ou le maintien de la marque H3K27me3, apprécié selon différents arguments discutés en introduction. Cinq étapes ont été nécessaires au séquençage (Figure 43).

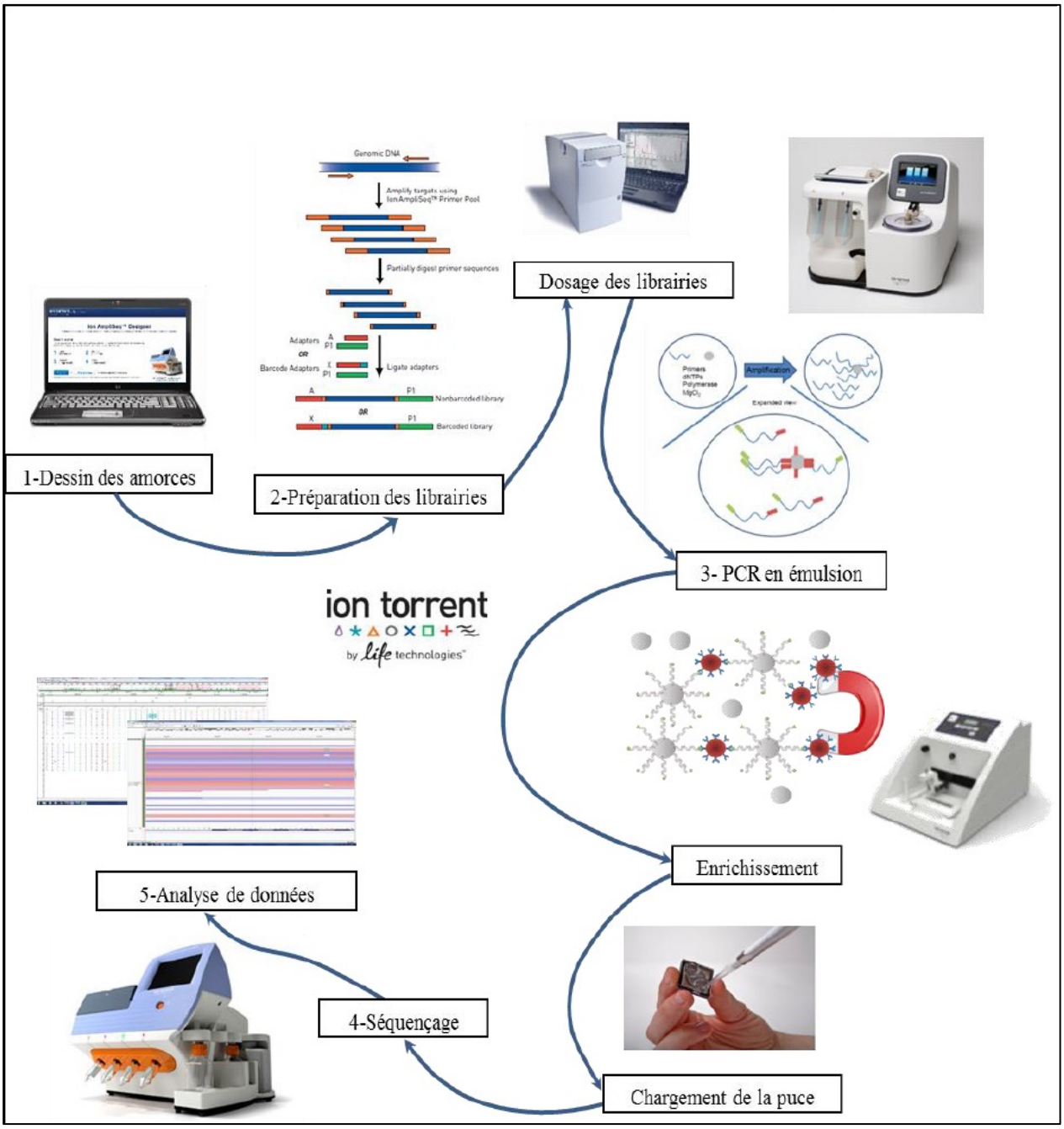


Figure 43. Cinq étapes sont nécessaires au NGS.
(1) Dessin des amorces, (2) Préparation de la librairie par PCR multiplex, (3) PCR en émulsion puis enrichissement, (4) Séquençage NGS et (5) Analyse bio-informatique des données générées.

- Dessin des amorces

Les amorces permettant l'analyse des régions codantes et introniques flanquantes (25 pb) des 14 gènes impliqués dans la méthylation d'H3K27 (*EZH1, EZH2, EED, SUZ12, JARID2, PCL1, PCL2, PCL3, AEBP2, KDM6A, SIRT1, HDAC2, RBBP4* et *RBBP7*) ont été dessinées via l'interface web *Ion AmpliSeq Designer*™ de Lifetechnologies. Les 357 paires d'amorces, réparties en deux pools permettaient la réalisation de deux PCR multiplex. Les fragments générés (amplicons) d'une taille moyenne d'environ 200 pb (125 à 225 pb) assuraient une couverture théorique de 94,83% de la région cible, soit 58,23kb (Tableau VII).

Tableau VII. Détail des séquences génomiques choisies pour le design, des séquences exoniques théoriquement séquencées et de la couverture théorique par gène.

Nom du gène	NM (UCSC)	Chromosome	Nombre d'exons	Séquences ciblées théoriques (pb)	Séquences manquantes théoriques (pb)	Couverture théorique (%)
EZH1	NM_001991.3	17	21	2453	3	99,88
EZH2	NM_004456.4	7	23	2753	0	100
EED	NM_003797.3	11	14	1547	47	96,96
SUZ12	NM_15355.2	17	16	2396	261	89,11
RBBP4	NM_005610.2	1	13	1636	115	92,97
RBBP7	NM_001189719.1	X	13	1569	0	100
JARID2	NM_004973.3	6	19	3939	0	100
PCL1= PHF1	NM_024165.2	6	15	1584	28	98,23
PCL2=MTF2	NM_007358.3	1	15	2034	41	97,98
PCL3=PHF19	NM_001286840.1	9	19	2168	0	100
AEBP2	NM_153207.4	12	10	1695	756	55,4
KDM6A= UTX	NM_001291415.1	X	30	4525	7	99,85
SIRT1	NM_012238.4	10	11	2411	339	85,94
HDAC2	NM_001527.3	6	16	1621	76	95,31

Au total, 357 amplicons ont été générés *in silico* pour couvrir les 235 exons codants et les régions introniques flanquantes des gènes du panel.

- Préparation de la librairie

La préparation de la librairie NGS a été réalisée en utilisant le kit *Ion AmpliSeq Library 2.0* en suivant les recommandations du fabricant (Ion AmpliSeq™ Library Preparation, Revision 5.0, Lifetechnologies). Les dilutions de chaque échantillon d'ADN ont ensuite été dosées par fluorimétrie à l'aide d'un spectromètre de type *Qubit*™ (Lifetechnologies). Les différents ADN ont ensuite été dilués à 5 ng/µL. Deux PCR multiplex ont été réalisées par échantillon (quantité d'ADN nécessaire par PCR : 10 ng) à partir des deux pools d'amorces. L'ensemble des

amplicons ainsi obtenus constituait une librairie. Une courte séquence d'une quinzaine de paires de bases (appelée code-barre) propre à chaque échantillon a été intégrée à chaque amplicon pour identifier les échantillons. La librairie obtenue a ensuite été purifiée grâce à des billes *Agencourt AMPure XP* (Beckman Coulter, Brea, CA, USA). La quantité des amplicons ainsi obtenus pour chaque échantillon a été mesurée par un dosage sur *Qubit*. Après avoir été diluées à une même concentration (12 pM), les librairies ont été mélangées.

- Amplification par PCR en émulsion puis enrichissement de la librairie

Une PCR en émulsion a ensuite été réalisée à partir du mélange des librairies sur un *Ion OneTouch*® (Lifetechnologies), permettant la formation d'une émulsion eau dans huile. L'amplification monoclonale des différents fragments de la librairie a été réalisée à la surface de sphères (*ISP, Ion Sphere Particules*) présentes au sein des gouttelettes d'eau de l'émulsion. L'enrichissement des ISPs recouvertes des amplicons a ensuite été effectué sur un *Ion OneTouch™ ES* (Lifetechnologies) selon les recommandations du constructeur. Cette étape permet d'éliminer par des lavages successifs, les ISP non recouvertes d'amplicons et les substrats non utilisés au cours de la PCR en émulsion. Enfin, un dosage des ISP a été réalisé sur *Qubit* avant le séquençage.

- Séquençage

Les ISP recouvertes des amplicons ont été déposées sur une puce *Ion 318™* et séquencées sur l'*Ion PGM™ sequencer* (Lifetechnologies). La puce de format *Ion 318™* est recouverte d'environ 11 millions de puits qui peuvent accueillir chacun une ISP. Au sein de chacun des puits, une réaction de séquençage par élongation a lieu. Les quatre types de dNTP sont injectés successivement à la surface de la puce. Une injection d'un nucléotide correspond à un flux. L'incorporation d'un nucléotide par formation d'un pont phosphodiester s'accompagne du relargage d'un proton détecté par mesure de la variation de pH. Les mesures de variations de pH (traduites en variations de potentiel) sont effectuées simultanément au sein de l'ensemble des puits après chaque flux. Les flux successifs des quatre dNTP correspondent à un cycle et 520 cycles ont été effectués lors de la réaction de séquençage.

- Analyse bio-informatique des données

Les données brutes des différentes « lectures » (un fragment lu est appelé *read*) ont été générées sous forme de fichiers DAT qui sont par la suite convertis en fichiers WELL. Ces derniers ont ensuite été alignés sur une séquence de référence (génome humain, hg19) grâce au logiciel *Ion Torrent Suite* (Lifetechnologies) permettant l'obtention de fichiers SAM (fragments lus positionnés sur le génome : reads avec coordonnées) qui ont ensuite été comprimés en fichiers BAM (Figure 44).

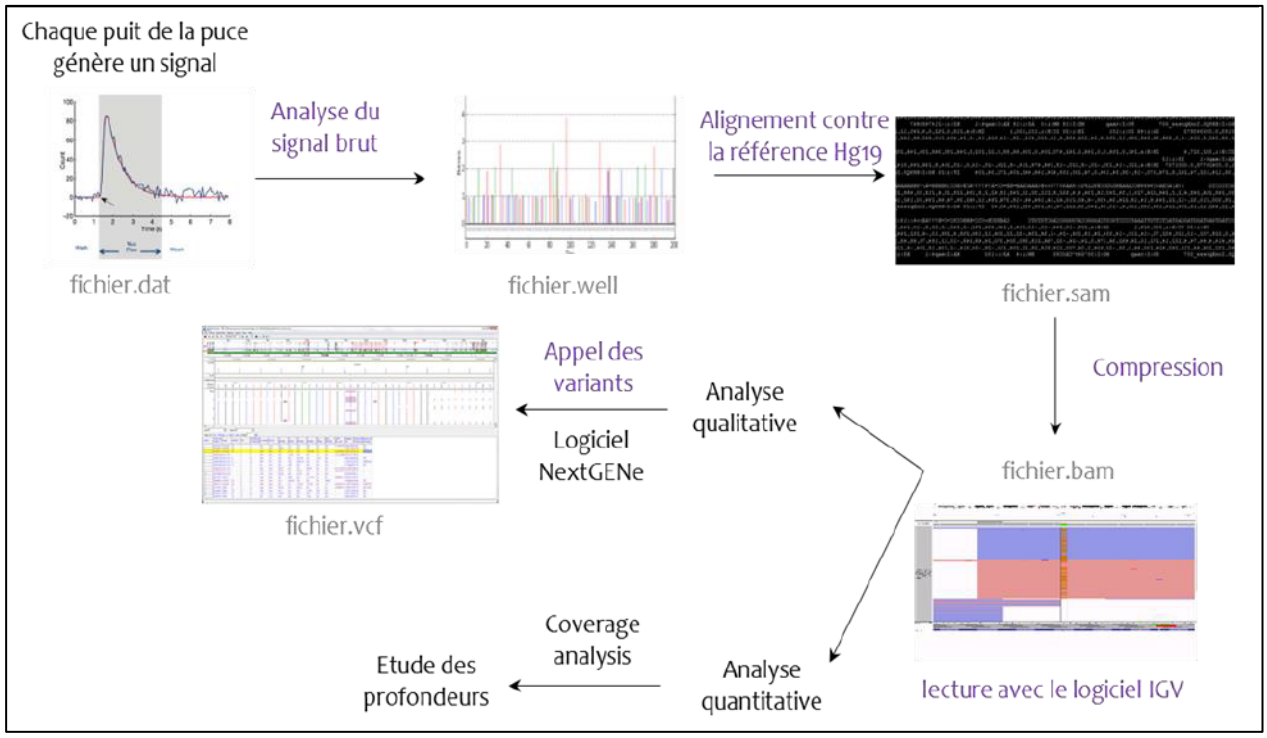


Figure 44. Processus de l'analyse bio-informatique depuis la génération du signal jusqu'à l'identification des variants de séquences : génération des différents formats de fichiers.

- Appréciation de la profondeur et de la couverture de séquençage

La profondeur est le nombre de lectures pour une base séquencée (exprimée en nombre de lectures ou X). La couverture est la proportion de la séquence d'ADN réellement amplifiée et séquencée. Elle peut être exprimée en valeur absolue (en pb) ou par rapport à la séquence ciblée (en %).

La profondeur de chaque amplicon pour chaque échantillon a pu être déterminée grâce à l'analyse du fichier BAM via le *plugin Coverage Analysis* (Lifetechnologies). Le logiciel *Integrative Genomics Viewer* (IGV v.2.3, Broad Institute) a également été utilisé pour la visualisation des *reads* (fragments séquencés).

- Identification des SNV (*Single Nucleotide Variations*) et des petites insertions et/ou délétions

La sélection bio-informatique des SNV et des petites insertions et/ou délétions a été effectuée selon les étapes suivantes :

1. Alignement des *reads*
2. Détection des variants
3. Filtrage des variants
4. Annotation des variants

Tout d'abord, les *reads* ont été alignés sur la séquence de référence (génome humain, hg19) grâce au logiciel *Ion Torrent Suite* (Lifetechnologies) (Figure 44). Une position génomique unique (coordonnées) est attribuée à chaque fragment lu (*read*). Les *reads* présentant une identité

de séquence complète avec plus d'un *locus* ne sont pas conservés dans la suite de l'analyse (absence d'alignement ambigu).

Dans la deuxième étape de l'analyse, le logiciel *NextGENe software* v2.3.3 (Softgenetics, State College, Pennsylvania, USA) a été employé pour la détection (*calling*) des différents variants et leur visualisation dans les régions ciblées : ensemble des régions codantes des 14 gènes ainsi que les régions introniques flanquantes (25 pb). Les paramètres de détection choisis étaient :

- une fréquence allélique minimum (MAF, *Minimum Allele Frequency*) ≥ 2% pour la détection des SNV et de 5% de petites insertions et/ou délétions, par rapport à la profondeur
- une profondeur minimale ≥ 6X pour les SNV
- une profondeur minimale ≥ 15X pour les petites insertions et/ou délétions.

Un faible seuil de MAF a été choisi dans le but de limiter les faux négatifs.

Dans la troisième étape de l'analyse, les variants détectés ont été filtrés en se basant principalement sur la valeur du score de confiance (*variant score*) généré par le logiciel *NextGene* pour chaque variant détecté. Ce score de confiance est une estimation empirique de la probabilité qu'un variant donné ne soit pas un artefact de séquençage ou une erreur d'alignement. Ce score repose sur (i) le ratio du nombre de *reads* "sens" et le nombre de *reads* "anti-sens" à une localisation donnée, (ii) la fréquence du variant dans les deux directions de lecture et (iii) le nombre d'erreurs d'appariement qui se sont produites dans une région de 10 pb située de part et d'autre du variant. Seuls les variants présentant un score ≥ 7 ont été sélectionnés,

Enfin, chaque variant filtré a été annoté. Pour chaque variant, a été considéré :

- Le type de variants : non sens, petites insertions ou délétions avec décalage du cadre de lecture, faux sens, isosémantiques, introniques,
- La présence de ces variants dans des bases de données de polymorphismes du génomehumain : *dbSNP* (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/) et *1000 Genomes*, (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/variation/tools/1000genomes/) et dans une base de données de mutations de cancer : *COSMIC* (*Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer)* (http://cancer.sanger.ac.uk/cancergenome/projects/cosmic/),
- Des scores de prédictions de modifications de la structure et la fonction protéique pour les variants faux sens : logiciel en ligne *Polyphen 2*,
- Des scores de prédiction de modifications de l'épissage : logiciels en ligne *HSF* (*Human Splicing Finder V3.0*, http://www.umd.be/HSF/) pour les variants introniques.

Dans cette 4ème étape, les variants non sens et petites délétions ou insertions avec décalage du cadre de lecture ont été sélectionnés. Les variants faux sens non répertoriés dans *1000 Genomes* et *dbSNP* (avec une MAF indiquée) ont également été sélectionnés, ainsi que les variants introniques prédits comme ayant une conséquence sur l'épissage.

Immunohistochimie H3K27me3

L'étude immunohistochimique sur coupes au sein des MPNST a été menée par le Dr. Nicolas Ortonne, Département d'Anatomo-Pathologie, hôpital Henri Mondor, AP-HP, Créteil. Les échantillons inclus en paraffine et fixés dans de la formaldéhyde ont été découpés en section de trois micromètres d'épaisseur. L'immunomarquage d'H3K27me3 (Millipore ; ref 07-449) a été réalisé à l'aide d'un dispositif Bond max (Menarini diagnostics, France) après traitement de l'antigène à la chaleur à pH=9.
Dans tous les échantillons, le marquage positif au sein des cellules endothéliales des vaisseaux capillaires devait être présent comme contrôle positif interne.

II-1.5. RESULTATS

II-1.5.a) Etudes génomiques

⇒ CGH-array

Parmi les 51 tumeurs, six (12%) portaient des délétions homozygotes dont le seul gène localisé dans la région minimale de recouvrement était *SUZ12*. Vingt-et-une autres tumeurs (41%) avaient une délétion hétérozygote de *SUZ12*. Parmi toutes ces délétions, 14 étaient des microdélétions de type 1, 2 ou 3 dans 12 tumeurs différentes. Une délétion focale au gène *SUZ12* a également été retrouvée dans une tumeur (Figure 45 et Figure 46).
De plus, quatre tumeurs (8%) présentaient des délétions homozygotes d'*EED* et huit tumeurs (16%) présentaient des délétions hétérozygotes d'*EED* dont une était une délétion focale du gène *EED* (Figure 45 et Figure 46).

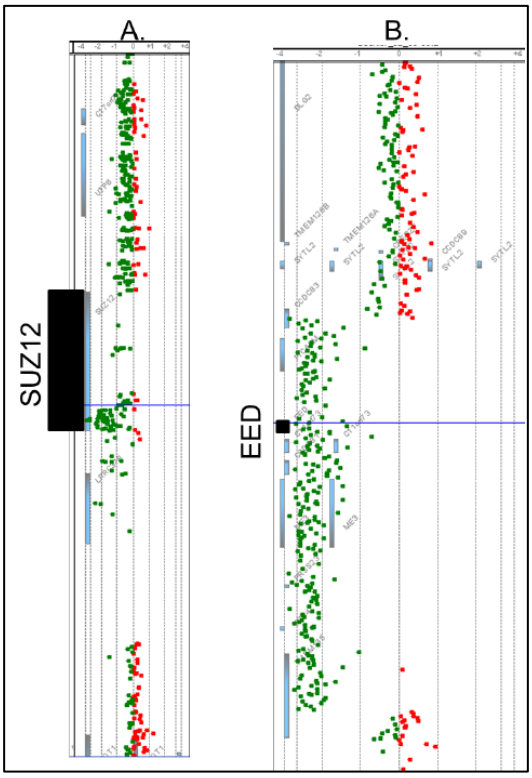


Figure 45. Profils de CGH-*array* de deux MPNST présentant une délétion.
Les gènes *SUZ12* et *EED* sont représentés par des carrés noirs. Les délétions sont visualisées par des déviations vers les valeurs négatives du *ratio* d'intensité de fluorescence au niveau des sondes (vert). Une délétion au sein du gène *SUZ12* est observée dans la tumeur A. Une délétion emportant le gène *EED* est observée dans la tumeur B.

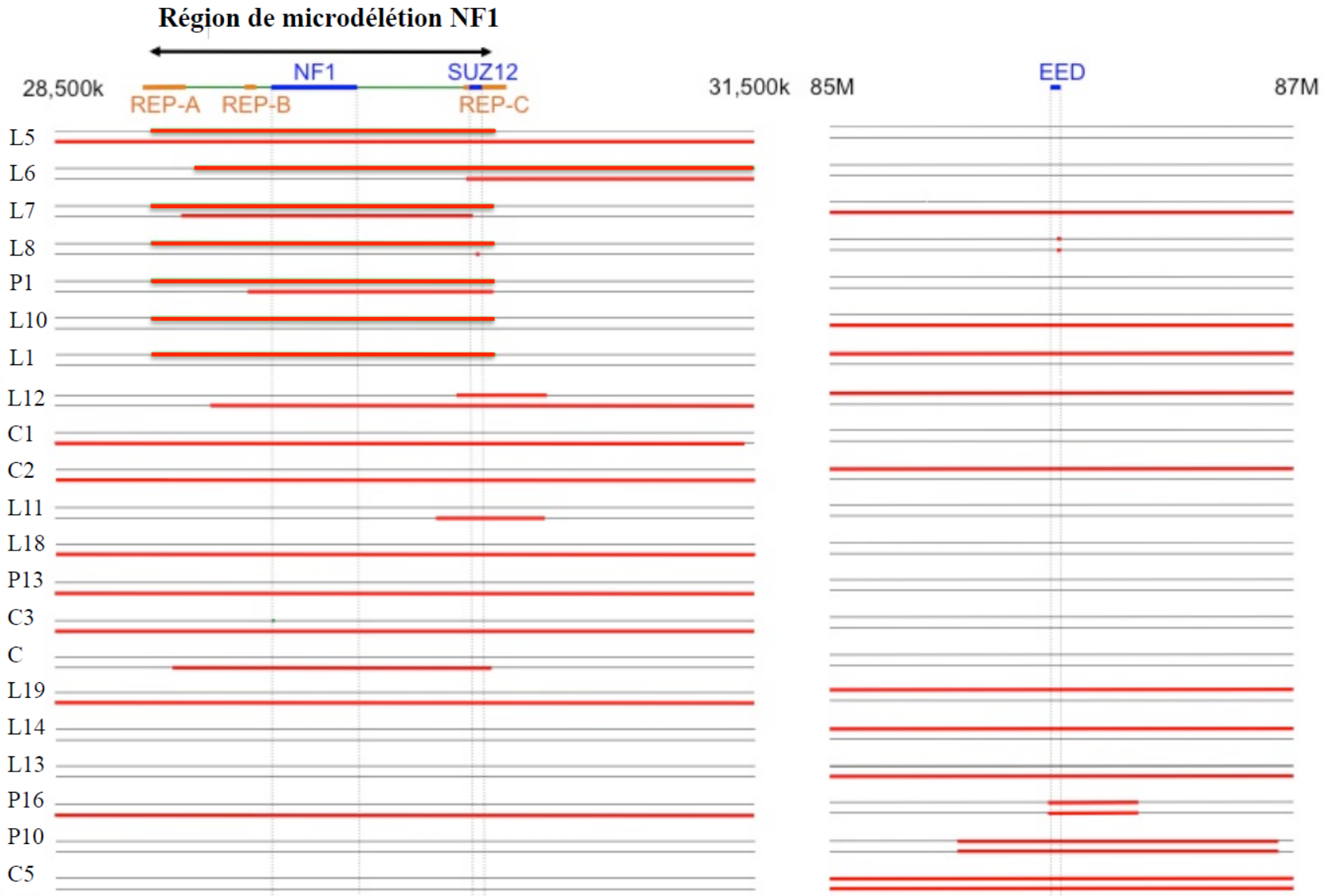


Figure 46. Représentation schématique de quelques résultats représentatifs de CGH-*array* des MPNST aux *loci* de *NF1*, *SUZ12* et *EED*.
En rouge : les délétions et en gris : chaque chromosome.

⇒ Séquençage ciblé NGS

Seize mutations (31%) de *SUZ12* ont été retrouvées dans les MPNST testées. La majorité de ces altérations étaient des mutations tronquantes c'est-à-dire à l'origine de l'apparition prématurée d'un codon stop (Tableau VIII). Ainsi quatre mutations non-sens, trois mutations d'un site d'épissage et sept petites insertions ou délétions décalant le cadre de lecture ont été retrouvées. Les autres mutations étaient deux mutations faux-sens prédites comme délétères par la base de prédiction Polyphen. Ces mutations perte de fonction de *SUZ12* étaient réparties sur toute la protéine sans point chaud de mutation (Figure 47).

Trois mutations (6%) tronquantes d'*EED* ont également été retrouvées dans trois autres tumeurs non mutées dans *SUZ12* : une mutation non-sens et deux mutations d'un site d'épissage (Tableau VIII; Figure 47).

Tableau VIII. Liste des mutations ponctuelles retrouvées dans *SUZ12* et *EED* dans les MPNST.
Les deux mutations faux sens sont indiquées en vert.

ID	Mutations de *SUZ12*	ID	Mutations d'*EED*
L17	c.275-46_275-2del; anomalie d'épissage	P7	c.874C>T; p.(Gln292*)
C1	c.496del, p.(His166Thrfs*24)	L14	c.635-1G>A; anomalie d'épissage
P15	c.731dup; p.(Met244Ilefs*10)	L11	c.727-8_769del; anomalie d'épissage
C4	c.961G>T; p.(Glu321*)		
L3	c.1216_1217delinsATGA, p.(Leu406Metfs*22)		
L4	c.1290T>A; p.(Tyr430*)		
L10	c.1293+1G>C; anomalie d'épissage		
P9	c.1356del; p.(Trp452Cysfs*4)		
L1	c.1430del; p.(Asn477Thrfs*11)		
C3	c.1433A>C, p.(Tyr478Ser)		
P13	c.1564A>T; p.(Arg522*)		
P17	c.1671_1672dup; p.(Ser558Ilefs*25)		
L9	c.1704del; p.(Ser568Argfs*14)		
L2	c.1768G>A; p.(Gly590Lys)		
P8	c.1851G>A; p.(Trp617*)		
P5	c.1875-7_2113del; anomalie d'épissage		

Parmi ces mutations, quatre de *SUZ12* et une d'*EED* étaient homozygotes sans délétion de la deuxième copie observée en CGH-*array*, faisant suspecter un mécanisme de CN-LOH (*Copy Neutral Loss Of Heterozygosity*).

Aucune mutation d'*EZH2* ni des 11 autres gènes testés n'a été rapportée.

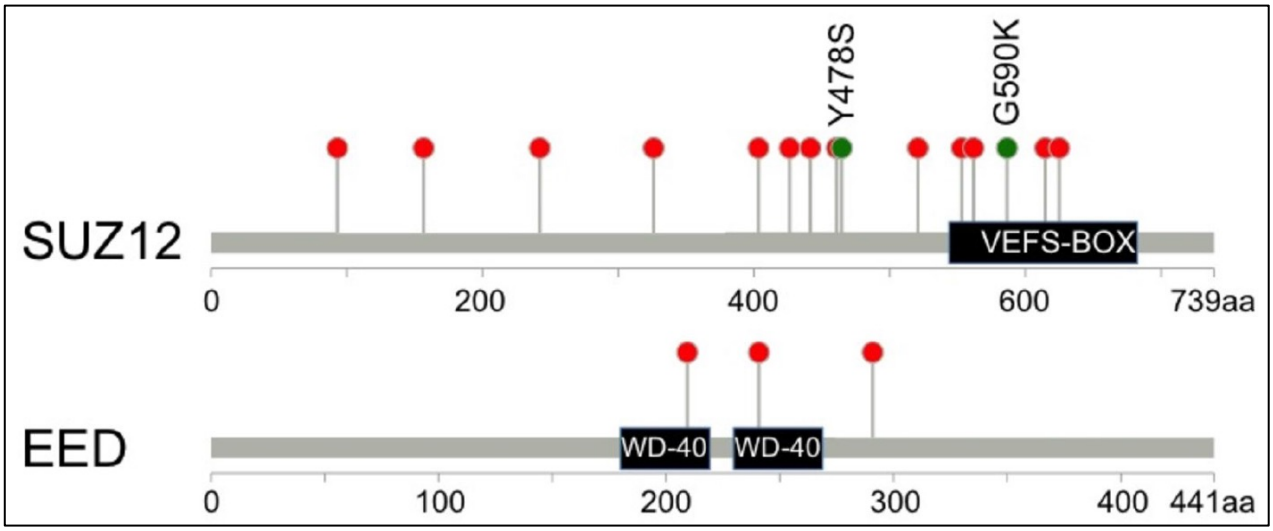


Figure 47. Représentation schématique des localisations des mutations de *SUZ12* et *EED*.
Les mutations tronquantes sont représentées en rouge et les mutations faux-sens sont représentées en vert.

⇒ Bilan des altérations des gènes SUZ12 et EED

En reprenant les données de CGH-*array* et de NGS, il s'avérait que 41% des MPNST présentaient une inactivation totale de SUZ12 et 12% une inactivation totale d'EED. Au total, 51% des MPNST présentaient une inactivation totale d'un des membres du PRC2. Les différents mécanismes étaient (i) une délétion homozygote, (ii) une délétion d'un allèle et mutation ponctuelle du 2ème allèle, (iii) deux mutations ponctuelles sur les deux allèles du même gène ou (iiii) une mutation ponctuelle d'un allèle et CN-LOH du 2ème allèle (Figure 48 et Annexe 4).

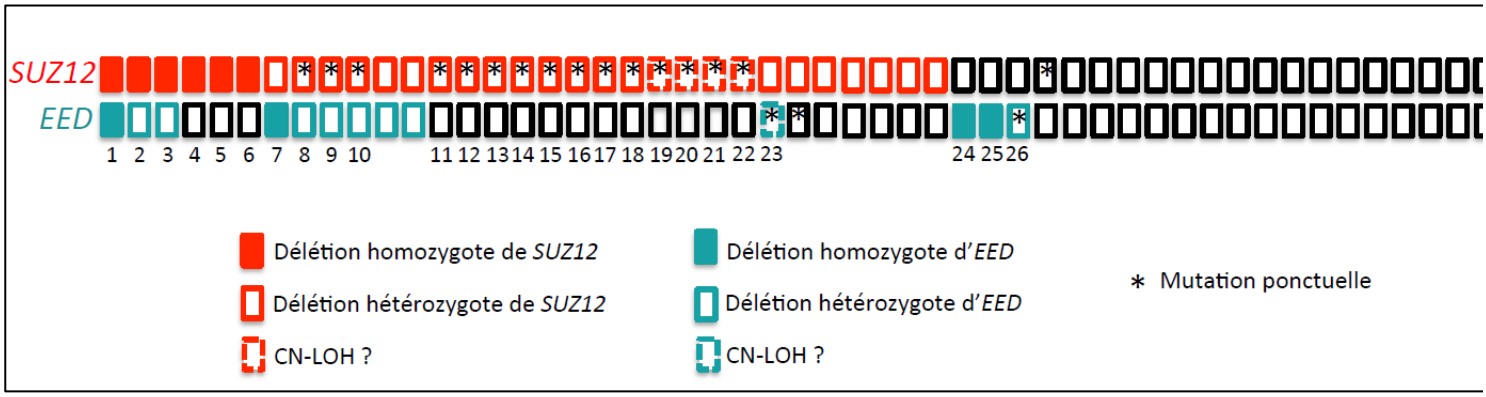


Figure 48. Bilan des altérations des membres du PRC2 retrouvées dans les MPNST.
Chaque rectangle correspond à une tumeur avec sur la première ligne les altérations de *SUZ12* et sur la deuxième, celle d'*EED*. Les délétions homozygotes sont représentées par des rectangles pleins (rouge pour *SUZ12* et bleu pour *EED*), les délétions hétérozygotes par des rectangles surlignés en couleur, les CN-LOH par des rectangles en lignes discontinues et les mutations ponctuelles par des étoiles. Vingt-six tumeurs (51%) présentaient une inactivation totale d'un des membres du PRC2.

II-1.5.b) Immunohistochimie

La perte de la marque H3K27me3 causée par les altérations du PRC2 a été confirmée par étude immunohistochimique sur coupe au sein des MPNST mutées (Figure 49 et Annexe 4). Cependant, trois MPNST montraient une perte de marquage H3K27me3 en immunohistochimie sans qu'aucune altération génomique des gènes étudiés n'ait été retrouvée (Annexe 4).

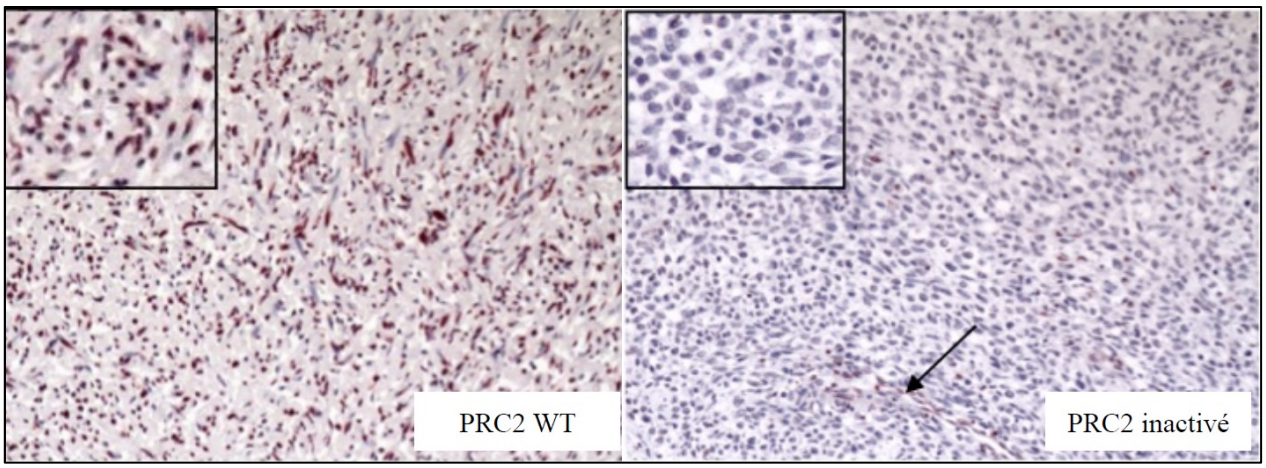


Figure 49. Exemple représentatif de marquages immunohistochimiques H3K27me3 sur coupes de MPNST.
Les tumeurs présentant des altérations des composants du PRC2 montraient une perte de la marque chromatinienne H3K27me3 visible en immunohistochimie sur coupes de MPNST. Le marquage était conservé au sein des cellules endothéliales non mutées des vaisseaux capillaires (contrôle, indiqué par la flèche).

Nos observations suggéraient pour la première fois que l'inactivation du PRC2 jouerait un rôle important dans le développement des MPNST, tumeurs malignes les plus fréquentes des patients atteints de NF1.

II-1.6. DISCUSSION

L'analyse de 51 MPNST par CGH-*array* et NGS ciblé a permis de mettre en évidence une inactivation du PRC2 dans plus de la moitié des tumeurs. La perte de la marque H3K27me3 causée par les altérations du PRC2 a été confirmée en immunohistochimie sur coupes de MPNST mutées. Cette étude montre pour la première fois que la perte du PRC2 est une étape majeure de la tumorigenèse des MPNST, première cause de mortalité des patients atteints de NF1. Ils suggèrent également l'implication du gène *SUZ12* dans les phénotypes plus sévères des patients porteurs de délétions constitutionnelles du *locus NF1*. Peu après la publication de notre travail, deux autres équipes ont publiés des résultats tout à fait similaires aux nôtres

(Zhang *et al*. 2014 ; Lee *et al.* 2014). Ces équipes retrouvent également des mutations inactivatrices de *SUZ12* et *EED* dans respectivement 32% et 70% des MPNST de patients NF1, associées à la perte d'H3K27me3.

L'inactivation des deux allèles de *SUZ12* ou *EED* suggère un rôle suppresseur de tumeur du PRC2 dans ce contexte tumoral. Un modèle à quatre évènements d'inactivation de *NF1* et du PRC2 pourrait ainsi être proposé, mimant celui impliquant *NF2* et *SMARCB1* (*SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily b, member 1*) décrit dans les schwannomatoses (Hadfield *et al.* 2008, Sestini *et al.* 2008). Avec cette étude, il n'est pas possible de déterminer si certaines altérations identifiées dans les MPNST étaient déjà présentes constitutionnellement ou dans les neurofibromes plexiformes desquels étaient issu les MPNST. Cependant Zhang *et al.* et Lee *et al.* n'ont retrouvé aucune mutation de *SUZ12* et *EED* dans les neurofibromes plexiformes, ce qui suggère le rôle crucial de la perte du PRC2 spécifiquement dans la progression maligne du neurofibrome plexiforme en MPNST.

De façon surprenante, une tumeur portait une délétion homozygote à la fois de *SUZ12* et d'*EED*. De plus, sept tumeurs portaient une altération homozygote de *SUZ12* ou *EED* et une délétion hétérozygote de l'autre gène. Cette relative redondance pourrait s'expliquer par une instabilité chromosomique génomique tumorale. En effet, comme préalablement décrit, les CGH-*array* de certaines MPNST montraient des altérations importantes de la structure du génome avec de nombreuses variations du nombre de copies (Kresse *et al.* 2008, Mantripragada *et al.* 2009, Brekke *et al.* 2010) (Figure 50).

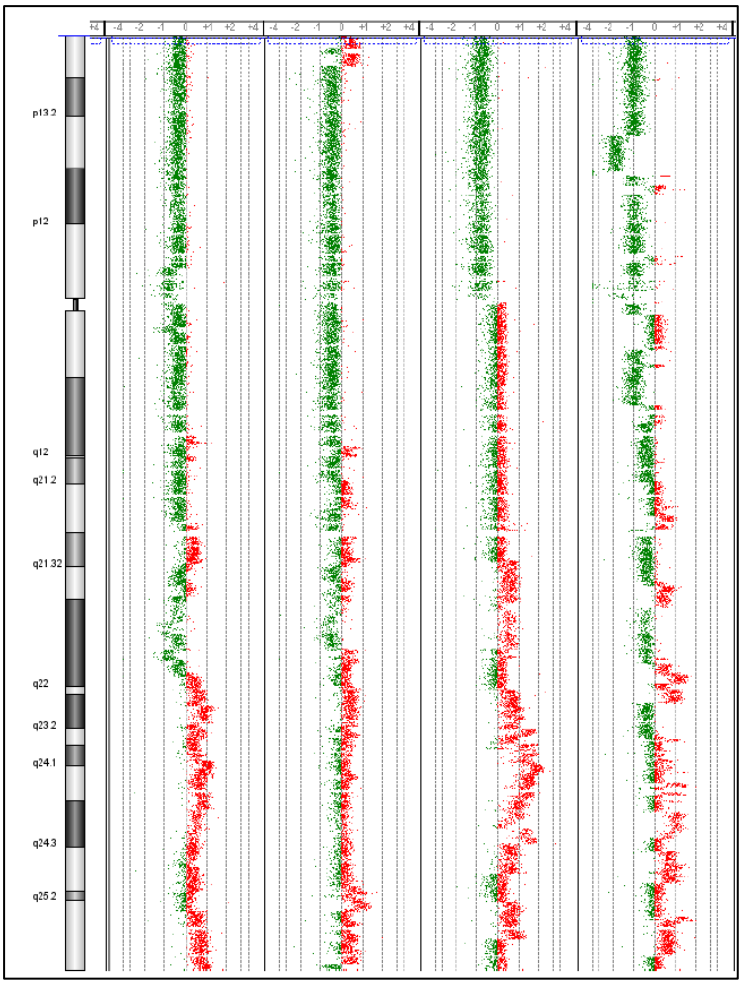


Figure 50. Profil de CGH-*array* du chromosome 17 pour quatre MPNST.
Une déviation vers les valeurs négatives du *ratio* d'intensité de fluorescence au niveau des sondes (vert) signifie une perte de matériel chromosomique et une déviation vers les valeurs positives de ce *ratio* (rouge) signifie un gain de matériel chromosomique. Les MPNST dont le profil du chromosome 17 est représenté ici montrent de nombreuses variations du nombre de copies.

Cinq tumeurs portaient des altérations homozygotes des gènes *SUZ12* ou *EED* sans que l'analyse par CGH-*array* de ces MPNST ait montré de délétions. L'hypothèse la plus probable est celle d'un mécanisme de perte d'hétérozygotie avec conservation du nombre de copies (CN-LOH) par isodisomie uniparentale totale ou interstitielle (Figure 51). Ce mécanisme a déjà été décrit pour l'inactivation somatique du deuxième allèle *NF1* dans des hémopathies myéloïdes de patients NF1 (Stephens *et al*. 2006). Il pourrait être prouvé par la mise en évidence d'une homozygotie des SNP autour du gène muté.

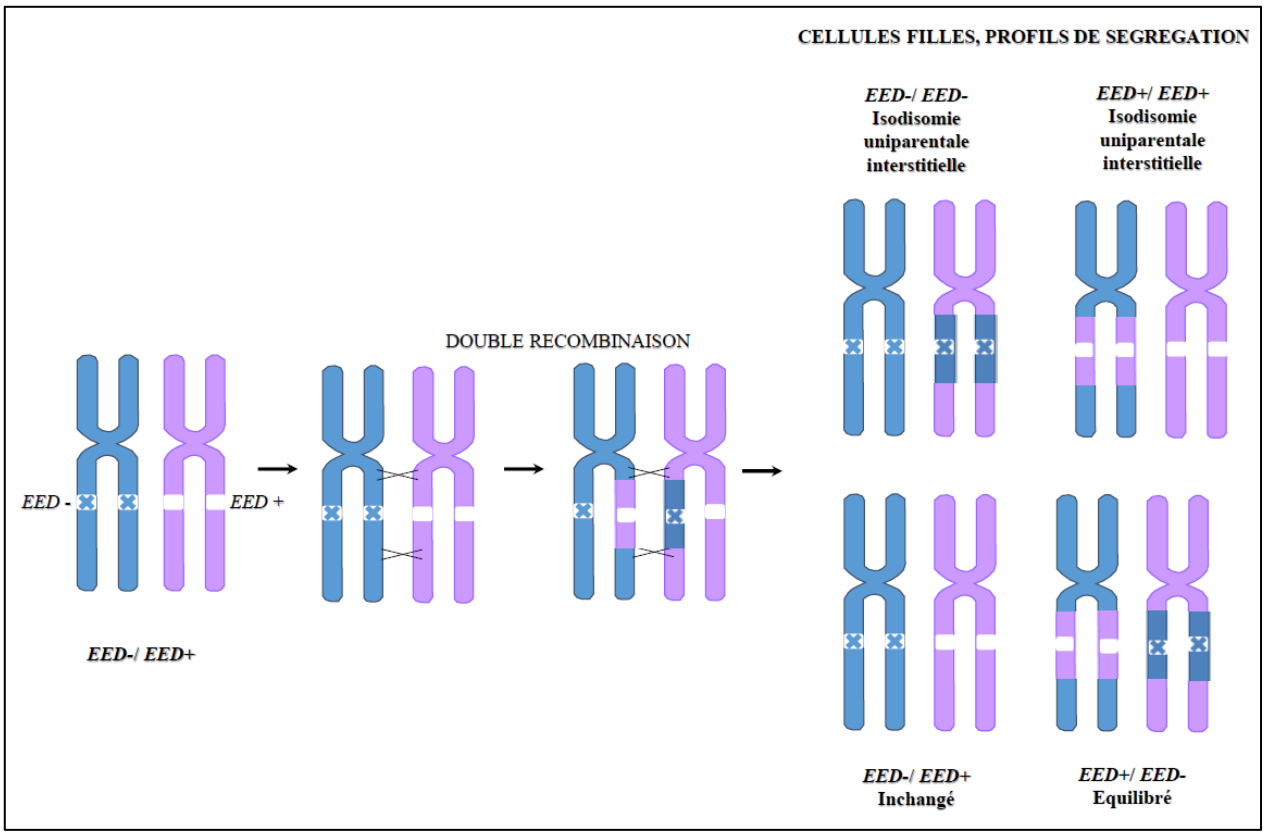


Figure 51. Schéma du modèle d'isodisomie uniparentale interstitielle proposé pour la tumeur mutée EED homozygote avec conservation du nombre de copies.
Les allèles mutés d'*EED* sont indiqués par des croix sur le chromosome. Les allèles sauvages d'*EED* sont représentés par un carré blanc. Une double recombinaison mitotique conduit à une isodisomie uniparentale interstitielle dans la tumeur. Les quatre cellules filles possiblement obtenues après cette recombinaison et leur génotype sont représentées. Inspiré de Stephens *et al.* 2006.

Trois tumeurs n'avaient aucune altération génomique pour les gènes étudiés alors qu'une perte du marquage H3K27me3 en immunohistochimie était observée. Le panel NGS dessiné n'est pas exhaustif. Il est à noter que d'autres protéines intervenant de façon incertaine dans la méthylation d'H3K27 et interagissant transitoirement avec le PRC2 (par exemple YY1 (*YY1 transcription factor*)) n'ont pas été séquencées.

De plus, 13 tumeurs ne présentaient aucune altération d'*EED*, de *SUZ12* ou d'aucun autre acteur étudié de la méthylation H3K27. Pour ces tumeurs, il serait intéressant d'étudier par exemple des protéines effectrices qui agissent en aval du PRC2 comme celles constituant le PRC1 dont le recrutement est favorisé par l'apposition d'H3K27me3. La deuxième déméthylase d'H3K27me3, KDM6B, ou des protéines acétylatrices d'H3K27 qui interagissent avec le PRC2 comme HDAC1 (*Histone DeAcetylase 1*) pourraient également être analysées. D'autre part, des membres des voies de signalisations ciblées par le PRC2 dans les cellules de Schwann sont de bons candidats pour être impliqués dans la tumorigénèse NF1

et devraient être identifiés et séquencés. Les histones elles-mêmes pourraient être explorées et en particulier au niveau du résidu lysine 27 puisque des altérations des résidus cibles de modifications post-traductionnelles ont déjà été mises en évidence dans des cancers (Maze *et al.* 2014).

Etant donné les fonctions antagonistes des complexes PcG et Trx (abordé dans l'introduction générale), il serait intéressant d'explorer les gènes des complexes Trithorax dans les MPNST sans mutation de PcG. Comme pour PcG, les protéines du groupe Trx sont organisées en complexes multiprotéiques au sein desquels se trouvent les histones méthyltransférases MLL1 (KMT2A), MLL2 (KMT2B), MLL3 (KMT2C) et MLL4 (KMT2D) responsables de la mono-, di- et tri-méthylation d'H3K4. La méthylation d'H3K4 est associée à un état transcriptionnel actif des gènes. Comme pour PcG, divers composants des complexes Trx sont impliqués dans les cancers ; un des exemples les plus connus étant le réarrangement du gène *MLL1* à l'origine de la génération d'un transcrit de fusion oncogénique dans les leucémies (Piunti et Shilatifard 2016). Les complexes PcG et Trx ayant un rôle opposé dans la balance des états d'expression des gènes, il pourrait donc être envisagé qu'une activation des complexes Trx ait *in fine* une conséquence équicalente à la perte de fonction de PcG.

Enfin, d'autres mécanismes plus complexes pourraient être explorés pour expliquer le mécanisme de transformation à l'origine de ces MPNST sans mutation de PcG. Par exemple, dans des sarcomes synoviaux, le transcrit de fusion oncogénique SS18-SSX remplace la sous-unité SS18 sauvage au sein d'un complexe SWI/SNF. Le complexe SWI/SNF altéré, alors formé, se fixe au niveau des gènes cibles du PcG et conduit à l'activation des gènes cibles PcG (Kadoch *et al.* 2013).

Les résultats de ce travail soulignent l'importance du diagnostic moléculaire des patients atteints de NF1. Ils apportent une explication rationnelle au risque plus élevé de développer des MPNST chez les patients porteurs d'une délétion récurrente constitutionnelle incluant *NF1* et *SUZ12* par rapport aux patients avec une mutation restreinte au gène NF1. Les patients NF1 délétés doivent donc être diagnostiqués et doivent bénéficier d'une surveillance rapprochée.

La perte du marquage immunohistochimique H3K27me3 est une aide précieuse au diagnostic des MPNST. Deux études anatomo-pathologiques de sarcomes, schwanomes et neurofibromes variés retrouvent une perte du marquage H3K27me3 dans les MPNST et pas dans les neurofibromes (Röhrich *et al.* 2016 ; Cleven *et al.* 2016). De plus, des études de

survie effectuée par Cleven *et al.* montrent une association entre la perte d'H3K27me3 et une diminution de la survie des patients. Des études additionnelles sont nécessaires pour confirmer la perte de la marque H3K27me3 comme facteur de mauvais pronostic.

En s'inspirant de ce travail, l'hypothèse suivante pourrait être formulée : l'inactivation du PRC2 pourrait être responsable des anomalies de croissance et de la dysmorphie faciale retrouvées chez les patients porteurs de délétions récurrentes du *locus NF1*. De façon comparable au syndrome de Weaver, l'inactivation du PRC2 conduirait à ces symptômes. Il pourrait donc, à l'avenir, être intéressant d'explorer cette hypothèse.

II-2. Investigation de l'absence de mutations d'*EZH2* dans les MPNST associées à la NF1.

Article 3:

Luscan A, Wassef M, Pasmant E, Kersouani C, Wallace M, Vidaud M, Margueron R. Investigation of the absence of *EZH2* mutation in NF1-linked MPNST tumorigenesis.
En préparation

II-2.1. Introduction

Neurofibromatosis type 1 (NF1; OMIM 162200) is a relatively common tumor predisposition syndrome, which has a worldwide birth incidence of 1 in 2500, and a prevalence of at least 1 in 4000. It results from a germline mutation in the tumor suppressor *neurofibromin 1* (*NF1*) gene (Ratner and Miller 2015). *NF1* encodes a negative regulator of the Ras proto-oncogene and its loss drives cancer by activating Ras (Rauen 2013). NF1 patients are at an increased risk of developing both benign and malignant tumors. The most common NF1-associated tumors are benign peripheral nerve-sheath tumors called neurofibromas. Neurofibromas are the hallmark and defining feature of NF1. Schwann cells were early on considered to be the most likely cell of origin for neurofibromas in NF1. Approximately 30-50% of individuals with NF1 develop a specific subtype of neurofibromas called plexiform neurofibromas (PNFs). A significant portion of PNFs (5-10%) eventually undergoes malignant transformation and progress to malignant peripheral nerve sheath tumors (MPNSTs) (Brems et al. 2009). The lifetime risk of a MPNST in patients with NF1 is 8-13% with an estimated annual incidence of 0.16% (compared with 0.001% in the general population) (Hirbe and Gutmann 2014). With a poor prognosis, MPNSTs represent a highly aggressive subtype of soft-tissue sarcoma, which metastasize early and are often resistant to radiotherapy and chemotherapy. MPNST is the most significant cause of death for NF1 patients younger than 40 years of age.

Little was known of the genetic alterations that mediate progression from PNFs to MPNSTs in individuals with NF1. Recent MPNSTs genomic analysis identified a high incidence of inactivating mutations in genes encoding subunits of the Polycomb repressive complex 2 (PRC2), suggesting an important role of this complex in MPNST tumorigenesis (De Raedt *et al.* 2014; Lee *et al.* 2014; Zhang *et al.* 2014).

PRC2 is involved in maintaining transcriptional repression via its chromatin modifying activity. PRC2 consists of four core subunits: Enhancer of Zeste Homolog 1/2 (EZH1/2), Embryonic Ectoderm Development (EED), Suppressor of Zeste 12 homolog (SUZ12) and Retinoblastoma-Binding Protein 4/7 (RBBP4/7) (Margueron and Reinberg 2011). EZH1/2, the catalytic components, function as

histone methyltransferases that trimethylate lysine 27 on histone 3 (H3K27me3), a mark associated to transcriptional repression.

EZH1 and EZH2 have been shown to bind the same target genes and although EZH1 is less active than EZH2, both enzymes have been reported to be redundant in some cell types (Margueron *et al.* 2008, Ezhkova *et al.* 2011). EED, SUZ12 and RBBP4/7 are required for PRC2 enzymatic activity *in vitro*. Cofactors such as AEBP2, PCLs or JARID2 were recently shown to be necessary for optimum PRC2 activity although they are not strictly required for PRC2 enzymatic activity *in vitro*. Strikingly, only loss-of-function mutations affecting *EED* or *SUZ12* but not *EZH2* nor *EZH1* are associated to the transition from PNFs to MPNSTs.

The absence of mutations affecting *EZH1* or *EZH2* in NF1-related MPNSTs is particularly surprising since loss of EZH2 function occurs in several other types of cancer. Indeed, inactivating mutations of EZH2 have been reported in various hematological malignancies such as myeloproliferative neoplasms and myelodysplastic syndromes (Ernst *et al.* 2010, Nikoloski *et al.* 2010) or T-acute lymphoblastic leukemia (Ntziachristos *et al.* 2012, Zhang *et al.* 2012). Hypomorphic mutations in genes encoding *SUZ12* and *EED* were also found in these malignancies but at lower rates.

This suggests that EZH2 might have additional PRC2-independant functions that are required for MPNST tumorigenic properties. Several recent studies indeed suggest that EZH2 might function independently of its enzymatic activity within PRC2. For instance, physical association between EZH2 and androgen receptor (AR) and estrogen receptor (ER) in prostate and breast cancers respectively, has recently been reported (Xu *et al.* 2012, Lee *et al.* 2011). More strikingly, these studies suggest that EZH2-AR and EZH2-ER complexes participate in transcriptional activation. Morover, in several cancer cells, PRC2-indepedant interaction between EZH2 and β-catenin was reported (Shi *et al.* 2007; Li *et al.* 2009; Jung *et al.* 2013). Additionally, Jung *et al*. showed that EZH2 recruitment to the β-catenin transcriptional complex specifically enhanced Wnt-target gene transactivation, independently of EZH2's methyltransferase activity in colon cancer cells. Since we previously reported an aberrant Wnt signaling hyperactivation in MPNST (Luscan *et al.* 2014), a methyltransferase-independent role of EZH2 in transactivating β-catenin targets was a hypothesis to challenge in our models.
Alternatively, EZH1, the second catalytic subunit of PRC2, might compensate for the loss of EZH2 in MPNST, explaining why this event is not selected for during tumor progression.

In order to determine whether EZH2 engages in new interaction in the absence of SUZ12 or EED, we first characterize the interactome of EZH2 in this context. We then analyzed the function, if any, of the residual PRC2 complex by genetic approach, knocking out EZH2 to determine the cellular and

transcriptomic consequences. Finally, we tested the redundancy between EZH2 and EZH1 in Schwann cells.

II-2.2. Material and methods

Cell lines

NF1 mutated 88-14 and NF1 WT STS26T cell lines were kindly provided by Pr. Nancy Ratner. 88-14 was derived from a NF1 MPNST and STS26T was established from metastasis of a malignant left scapula sarcoma grade II/III (Dahlberg et al. 1993). 88-14 and STS26T cell lines were cultivated at 37°C and 5% CO2 in advanced RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*, Invitrogen) media supplemented with 20% FBS and 0,32% bovine pituitary extract (Invitrogen).
LNCaP-abl cell line was kindly provided by Pr Zoran Culig. It was previously used as a model of androgen-independent prostate cancer. It was cultivated at 37°C and 5% CO2 in RPMI 1640 media (Invitrogen) supplemented with 10% FBS.
Pr Margaret Wallace derived an immortalized human Schwann cell line (SPW1) from a plexiform neurofibroma. SPW1 carry homozygous NF1 mutation c.3456insA; p.Leu1153fs.

Transfections

Cell transfection was performed using Polyethylenimine (PEI) "Max" from Polysciences (#24765) and Hepes Buffer. Protocoles were optimized for each cell line based on Hsu and Uludag (2012).

Stable expression of Flag-tagged EZH2 or SUZ12 in cell lines

The MSCV-hygro-Flag-Ezh2 retroviral vector was obtained from Addgene (24926). The MSCV-hygro-SUZ12 retroviral vector was obtained from subcloning MSCV-hygro vector obtained from Addgene (634401). Retroviruses were produced by co-transfection of HEK-293T cells with pMD2G, pUMVC and MSCV-hygro-SUZ12 vectors at 1:9:10 ratio. Viral supernatants were collected 48 and 72 hours post-transfection and filtered with a 45um syringe filter. Infection of 88-14 and STS26T cells was performed by incubation with viral supernatants in the presence of Polybrene 8mg/ml. Following retroviral infection, cells were selected with 400 µg/mL Hygromycin B (Invitrogen).

Proliferation assay in presence of UNC1999 or its control UNC2400

100000 cells were plated in 6 well plates in triplicates in presence of UNC1999 (Sigma), one EZH1/EZH2 inhibitor or UNC2400 (Bio-techne), its negative control compound, at 1µM or 3µM and counted every 24 hours over 4 days using a Vi-cells counter (Beckman-coulter). A second test was performed after 1 week of culture in presence of UNC1999 or UNC2400 at 1µM or 3µM. H3K27me3 WB was performed after each proliferation assay to assessed UNC1999 efficiency.

In vitro colony formation assays

6-wells plates were coated with 0,5% base agar layer + 1X DMEM. 100,000 cells/ml were plated with 0,7% agarose on these plates and incubated at 37°C for 10 to 30 days. Plates were stained with 0.5 ml of 0.005% Crystal Violet for more than 1 hour and then destained using destaining buffer (10% methanol 50% acetic acid). Finally, colonies were counted colonies.

Constitutive knockouts with the CRISPR-Cas9 strategy

EZH2 and *EZH1* inactivation was performed using the genome editing CRISPR (*Clustered regularly interspaced short palindromic repeats)*-Cas9 technology. The strategy used in the lab was based on the co-transfection of Cas9, gRNA and a donor template encoding a puromycin selection cassette, which promotes the homology directed repair (HDR) of the Cas9 induced-double strand break (Wassef *et al.* in preparation). Targeting vector induced-HDR resulted in the in frame insertion of the puromycin resistance cassette at the *EZH2* 6th exon and *EZH1* 7th exon. The puromycine cDNA is

downstream a T2A sequence and upstream a polyA sequence leading to the production of a truncated RNA encoding the first exons together with the puromycin resistance protein.

- *In silico design*

The gRNA sequence was chosen on the http://crispor.tefor.net/crispor.cgi website. PCR primers sequences were design on the NCBI tools/primer website. The sequences were the following:

EZH2-right	EZH2-right-Xho1-fw	atgactgCTCGAGGCCTGATTATTAGGATTCTGTGTAGC
	EZH2-right-Apa1-rev	tcgatcGGGCCCCACCAACTATTGACTCTGTTTCTTCC
EZH2 left	EZH2-left-Spe1-fw	atgactgACTAGTCTCTTGGAAAAAGGGGCTAAAGAAT
	EZH2-left-Bgl2-rev	tcgatcAGATCTGAAGTTCCTATACTTTCTAGAGAATAGGAACTTCTCTTCTCTTTCTTC AGGATCGTCTC
gRNA-hEZH2-	gRNA-EZH2-fw	TTTCTTGGCTTTATATATCTTGTGGAAAGGACGAAACACCGATCTGGAGGATCACC GAGA
	gRNA-EZH2-rev	GACTAGCCTTATTTTAACTTGCTATTTCTAGCTCTAAAACTCTCGGTGATCCTCCAG ATC
EZH2 left insertion screening	hEZH2-screen-left-fw	AAATTATGATGGGAAAGTACACGGG
	T2A-rev-V2	CGTCACCGCATGTTAGAAGACT
EZH2 right insertion screening	polyA-fw	CACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTC
	hEZH2-screen-right-rev	GCTATTTCACCCGCCAAATTATTCT
EZH2 WT screening	hEZH2-WT-screen-N1-fw	GTGTTTCTGACATTTGATGCGTTTC
	hEZH2-WT-screen-N1-rev	GCCCTATTTCTACTCTTTCTACTGT
EZH1-right	EZH1-right-Xho1-fw	atgactgCTCGAGCAGTAACAAGAAAGAGAAAGCGACA
	EZH1-right-Apa1-rev	tcgatcGGGCCCACCTAACCACTGATTGTTTGGAGA
EZH1 left	EZH1-left-Spe1-fw	atgactgACTAGTCGTGTGTAAGAAATGGAAAGAGGAG
	EZH1-left-EcoR1(HF)-rev	tcgatcGAATTCGAAGTTCCTATACTTTCTAGAGAATAGGAACTTCAAGCTTAAAACAG CATCACTAATCAGAACGG
gRNA-hEZH1	gRNA-EZH1-fw	TTTCTTGGCTTTATATATCTTGTGGAAAGGACGAAACACCGAATCAGTACTCAGATG AGG
	gRNA-EZH1-rev	GACTAGCCTTATTTTAACTTGCTATTTCTAGCTCTAAAACCCTCATCTGAGTACTGA TTC
EZH1 left insertion screening	hEZH1-screen-left-fw	CTGAATCTCCCAGAAGTTGGTTTTA
	T2A-rev-V2	CGTCACCGCATGTTAGAAGACT
EZH1 right insertion screening	polyA-fw	CACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTC
	hEZH1-screen-right-rev	AGTGCGATTATCAGAACACGTAAAC
EZH1 WT screening	hEZH1-WT-screen-N1-fw	GCTCATCTTTCGAATCCTCATGTTT
	hEZH1-WT-screen-N1-rev	TCAATAGCATGTCGCTTTCTCTTTC

- *Vectors constructs and cloning*

The Cas9 came from Addgene (#41815). The gRNA cloning vector was built from the gRNA cloning vector from Addgene (#41824). The cloning vector and the targeting vector were constructed in the chemically competent E coli cells (DG1 Eurogentec).

- *Transfection and clones selection*

The Cas9, gRNA cloning vector and targeting vector were transfected in B10 with PEI at a 1:1:1 ratio 24h after plating of 4,8 millions of cells. 48h after transfection, cells received 0,5 ug/ml of puromycin (Invitrogen). The clones resulting from puromycin selection were then screened for the cassette insertion at the right location by PCR on genomic DNA. When only one of the two alleles was targeted, sequencing of the remaining alleles was performed to assess frameshift insertion or deletion. Protein knockouts were validated by Western blot analysis of nuclear extracts.

Nuclear extracts preparation

Cells were incubated with buffer A (10mM Hepes pH 7.9, 2.5mM MgCl2, 0.25M sucrose, 0.1% NP40 and protease inhibitors) for 10 min on ice, centrifuged at 8000 rpm for 10 min, resuspended in buffer B (25mM Hepes pH 7.9, 1.5mM MgCl2, 700 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 20% glycerol and protease inhibitors), sonicated and centrifuged at 14000 rpm for 15min.

Antibodies
Antibodies against EZH2, EED, SUZ12, and H3K27me2/3 were previously described (Margueron *et al.* 2008); Lamin B1 (ab16048) was purchased from Abcam; Flag M2 was purchased from Sigma (F1804). The dilution used for all primary antibodies were 1/3000.

Flag-coImmunoPrecipitation (IP)
1mg of nuclear extracts was diluted in BC250 (50mM Tris pH8.0, 250mM KCl, 1mM EDTA, 10% Glycerol and protease inhibitors) and incubated with the anti-FLAG M2 affinity gel (Sigma A220). The beads were then washed three times with BC250 + 0,05% NP40 and eluted with 0,2M glycine pH 2,6.

Chromatography analyses
Nuclear extracts were purified by anion exchange chromatography using a HiTrap Q HP 1ml column (GE Healthcare 17-1153-01). Elution was performed with an increasing KCl concentration gradient and the fractions were analyzed by Western blot. Gel filtration chromatography analyses were then performed on the eluted fraction containing EZH2 using a Superose 6 PC 3.2/30 2.4ml column (GE Healthcare 17I-0673-01). The native molecular size markers used for column calibration were thyroglobulin (669kDa), ferritin (440kDa), aldolase (158kDa) and conalbumin (75 kDa) (obtained from GE Healthcare). Superose columns were attached to a GE AKTA micro and HiTrap columns were attached to a GE AKTA purifier.

Native gel
The blue-native electrophoresis of PRC2 complexe was performed according to the manufacturer's recommendation. Briefly, the purified fraction containing EZH2 after anion exchange chromatography were dialyzed 2h at 4°C in 50ml of Native Page Sample Buffer 1X (Thermo Fisher Scientific BN2003) and PMSF (200uM) thanks Slide-A-Lyzer MINI Dialysis Unit (Thermo Fisher Scientific #69572). 4µL and 8µL of the dialyzat as well as 1µL of recombinant PRC2 complex purified from baculoviruses infected SF9 cells were prepared in 23µL of Native Page Sample Buffer 4X and protease inhibitors. Samples were loaded on the Novex® NativePAGE™ Bis-Tris gels (Thermofisher). NativeMark™ unstained standards were additionnaly loaded for size estimation of proteins in native PAGE. Migration was performed at 4°C with 200ml of light blue cathode buffer in internal tank and 600 ml of anode buffer in external tank. The running conditions were the following: 1h at 150V 9mA and then 30min 250V 3mA. Transfert was performed on a PVDF membrane. EZH2 Western Blot was then performed as usual.

Mass spectrometry (ms)
The general protocol used for IP-ms experiments was described in Baymaz *et al.* 2014.

II-2.3. Results

In the absence of SUZ12, EZH2 remains in a residual PRC2 complex and does not interact with new partners.

To determine the consequences of SUZ12 inactivation, we compared the residual PRC2 complex in a SUZ12-mutated MPNST cell line, 88-14 and in the STS26T PRC2 wild-type Schwann cell line. First, we loaded 88-14 and STS26T nuclear extracts on anion exchange column to enrich for PRC2 (Figure 1A, left panel). As expected, EZH2 eluted in the same fraction in both cell lines (Figure 1A, right panel). The fractions were then separated by gel filtration chromatography. EZH2 and EED co-eluted

regardless of SUZ12 status. However, the pattern of elution in the absence of SUZ12 is shifted one fraction later as compared to SUZ12 wild-type cells (Figure 1A, right panel). This result indicates that the apparent molecular size of PRC2 is reduced which is suggestive of a residual complex containing only EZH2 and EED.

To more directly investigate whether EZH2 could be involved in new interactions in the absence of SUZ12, we analyzed its interactome. We exogenously expressed a tagged version of Ezh2 (Flag-EZH2 in 88-14 and STS26T and used it to purify PRC2. Expression of Flag-EZH2 in 88-14 and STS26T was checked by Western blot (Figure S1A). After Flag-ImmunoPrecipitation, the samples were digested by trypsin and subjected to nanoLC-MS/MS on an Orbitrap-Velos mass spectrometer. Raw data were processed using MaxQuant, Flag-IP in the non-overexpressing cell lines were used as a control (Figure 1B). As expected, known PRC2 constituents were identified in STS26T such as EED, SUZ12, RBBP4 and RBBP7 core components and JARID2, AEBP2 and PHF1/19 cofactors. In contrast, in *SUZ12*-mutant cells, only EED remained bound to EZH2, in agreement with the co-elution of the two proteins observed by gel filtration. Of note, EZH2 and EED stoichiometries were sensibly the same in 88-14 and STS26T (Figure S1B). In addition, in both cell lines, DNAH17 (DyNein Axonemal Heavy chain 17) was identified but with only one peptide suggesting that it may not be a real EZH2 interactor despite the enrichment. In SUZ12-mutant cells, a potential novel EZH2 interactor, ZBTB17 (Zinc Finger And BTB Domain Containing 17) also known as MIZ1 (Myc-Interacting Zinc Finger Protein 1) appeared just above the fixed cut-off. ZBTB17 protein was expressed at the same level in both STS26T and 88-14 excluding the possibility of an abundance artefact (Figure S1C). However, we did not validate this interaction with PRC2 as shown by co-immunoprecipitation of Flag-EZH2-expressing STS26T or 88-14 (Figure 1C).

Altogether the data presented above suggests that in the absence of SUZ12, EZH2 remains linked to EED in a residual PCR2 complex and does not interact with new partners.

In LNCaP-abl cell line, EZH2 does not interact with PRC2 independent partner and has no PRC2-independent methyltransferase activity on cell growth.

The main evidence to support EZH2 function independent of its role within the canonical PRC2 complex comes from a study reporting physical association between EZH2 and AR and based on observation in the androgen-independent prostate cancer model cell line LNCaP-abl (Xu *et al.* 2012). This prompts us to determine whether, in this context, EZH2 is indeed part of variant PRC2 complex using the same approaches as previously described. Suprinsingly, chromatography analysis revealed co-elution of EZH2, EED and SUZ12 at an apparent molecular weight expected for the canonical PRC2 complex (Figure 2A). To ascertain this result we further analyzed PRC2 molecular weight on native gel reasoning that this method might be more sensitive to detect a subset on EZH2 engaged in an alternative complex (Figure 2B). Yet, again we found EZH2 running around 480kDa at similar size

than the recombinant PRC2 complex purified from baculoviruses infected SF9 cells. Having established that the core PRC2 complex is not altered in LNCaP-abl, we are currently performing mass spectrometry analysis to determine whether EZH2 could be involved in transient interaction with new partners (Figure 2C).

Next, we investigate whether EZH2 methyltransferase activity is required for cell growth as previously suggested. We compared LNCaP-abl proliferation when grown in presence of specific inhibitor of EZH2 catalytic activity. We treated cells with 1µM or 3µM of the EZH1 and EZH2 selective inhibitor UNC1999 during 4 or 8 days and compared cell growth to cells treated with the close analog and negative control UNC2400 (Figure 2D). We analyzed both the immediate response to EZH2 inhibitor as well as the response after effective inhibition of PRC2. Inhibition of EZH2 catalytic activity was verified by H3K27me3 Western blot at 4 and 8 days of treatment (Figure 2D). In none of these two experimental settings, we could detect a significant impact of EZH2 inhibition on LNCaP-abl cells proliferation (Figure 2D). The experiment after 8 days of treatment need to be done once again.

Altogether, our results suggest that EZH2 functions mostly within the canonical PRC2 complex and is not a major regulator of cell growth in LNCaP-abl.

EZH2 does not retain a specific function in the absence of PRC2 in MPNST cell line.

Although biochemical analysis suggests that EZH2 does not interact with new partners in MPNST, we investigated whether the residual PRC2 complex nonetheless retains specific function after SUZ12 loss. For this purpose, we compared the consequences of EZH2 inactivation in MPNST cell lines at the transcriptomic and cellular levels. Using CRISPR-Cas9 genome editing technology, we genetically inactivated *EZH2* in 88-14 cells (SUZ12 inactivated cells). Constitutive *EZH2* knockout was achieved using an exon targeting strategy as described in Figure 3A. *EZH2* knockout was confirmed both by PCR and Western blot (Figure 3B). To evaluate the functional inactivation of EZH2, we re-introduced SUZ12 in *EZH2* wild-type and knockout 88-14 cells. SUZ12 expression restored H3K27 trimethylation in *EZH2* wild-type but not in *EZH2*-knockout cells, confirming functional inactivation of EZH2 (Figure 3B).

We then compared cells growth properties and capacity to form colony upon reintroduction of SUZ12 88-14 depending on EZH2 expression status. Our preliminary data suggest that rescuing SUZ12 has major consequences on 88-14 cells that are alleviated by the lack of EZH2 (data not shown). We will further expand this experiment by analyzing the transcriptomic consequences of inactivating EZH2 in 88-14 cells, the RNA-seq are currently in progress.

EZH1 and EZH2 redundancy can explain the absence of their mutations in MPNST.

If EZH2 has no PRC2-independent activity in MPNST, the absence of EZH2 mutation could be explained by the redundancy between EZH1 and EZH2 functions in Schwann cells. To explore this

hypothesis, we took advantage of a cell line derived from neurofibromatosis plexiform. We have already inactivated *SUZ12* in this line and will compare it to the transcriptomic consequences of inactivating either *EZH1* or *EZH2* or both together. Gene inactivation is achieved through genome editing (CRISPR-Cas9). These experiments are in progress.

II-2.4. Discussion.

While this study is still in progress and we are awaiting further results to be able to draw definitive conclusions, our preliminary data already challenge the hypothesis that EZH2 has major role independent of canonical PRC2. Hence, although WNT signaling tends to be activated in MPNST, we could not identify any association between EZH2 and components of this signaling pathway in MPNST model cell line. Our mass spectrometry analysis of PRC2 interactome and biochemical characterization of residual PRC2 complex instead suggest that EZH2 forms a non-fonctional subcomplex with EED in the absence of SUZ12. The transcriptomic analysis comparing MPNST cells expressing EZH2 or not in a SUZ12 inactivated context will allow determining whether this residual complex retains any function in gene regulation.

Surprinsingly analyzing a cell line model of androgen independent prostate cancer in which EZH2 has been proposed to function independently of the canonical PRC2 complex, we could not confirm the previous observation. It is likely that the experimental setting used in this publication has been prone to artifact. For instance, we note that chromatography was performed directly on nuclear extract; the presence of nucleic acids could modify the elution of pattern. Also, we have shown that the transcriptional response to inactivating PRC2 requires many cell divisions in order to loose H3K27me3. The authors have used transiently transfected RNAi, which does not allow to appropriately evaluating the consequence of interfering with PRC2 expression.
It remains unclear why inactivation of *SUZ12* or *EED* is being selected for in MPNST, we hope that our comparative study of cells inactivated for *EZH1*, *EZH2* or both will address this question.

II-2.5. Figure legends

Figure 1. EZH2 stay linked to EED in a residual PCR2 complex in *SUZ12*-mutated MPNST cell line and do not form new complex.

A. Left panel: *SUZ12*-mutated 88-14 and *SUZ12*-WT STS26T nuclear extracts were purified by successive steps summarized in the scheme. Right upper panel: Western blot analysis of EZH2 distribution in the different fractions obtained by anion exchange chromatography performed on 88-14 and STS26T nuclear extracts. Right lower panel: EZH2 and EED Western blot analysis of the fractions eluted from gel filtration chromatography performed on the STS26T and 88-14 550 mM fractions. The asterisk represents the major EZH2 fractions of elution.

B. Mass spectrometry analysis of EZH2 interactome on STS26T (left panel) and 88-14 (right panel) stably infected with the Flag-tagged version of EZH2. Volcano plots represent mass spectrometry analysis of Flag-EZH2 cells compared to WT cells. DNAH17 is identified with 1 peptide only, it may not be a real interactor despite the enrichment.

C. Western blot analysis of co-ImmunoPrecitated proteins after Flag-ImmunoPrecipitation of Flag-88-14, WT 88-14, Flag-STS26T and WT STS26T nuclear extracts.

INput (IN), FlowThrough (FT), ELuted (EL)

Figure 2. In LNCaP-abl cell line, EZH2 do not interact with PRC2 independent partner and has no PRC2-independent methyltransferase activity on cell growth.

A. Left panel: Western blot analysis of EZH2 distribution in the different fractions obtained by anion exchange chromatography performed on LNCaP-abl nuclear extracts. Right panel: EZH2, EED and SUZ12 Western blot analysis of the fractions eluted from gel filtration chromatography performed on the LNCaP-abl 550 mM fraction. The asterisk represents the major EZH2 fractions of elution.

B. PRC2 molecular weight analysis on native gel in dialyzed fractions obtained after anion exchange chromatography compared to recombinant PRC2 complex purified from baculoviruses infected SF9 cells. EZH2 antibody was used in the revelation.

C. Mass spectrometry analysis of EZH2 interactome on LNCaP-abl stably infected with the Flag-tagged version of EZH2. Experiments in progress

D. Upper panel: Proliferation assay in LNCaP-abl treated with the EZH1/2 inhibitor UNC1999 or its negative control UNC2400 at 1µM and 3µM after 4 days of treatment. Lower panel: Western blot analysis of H3K27me2/3 and total H3 on treated LNCaP-abl.

INput (IN), FlowThrough (FT), ELuted (EL)

Figure 3. EZH2 do not retain specific function in the absence of PRC2 in MPNST cell line.

A. Scheme of constitutive *EZH2* knockout strategy in 88-14 cells using the CRISPR/Cas9 technique.

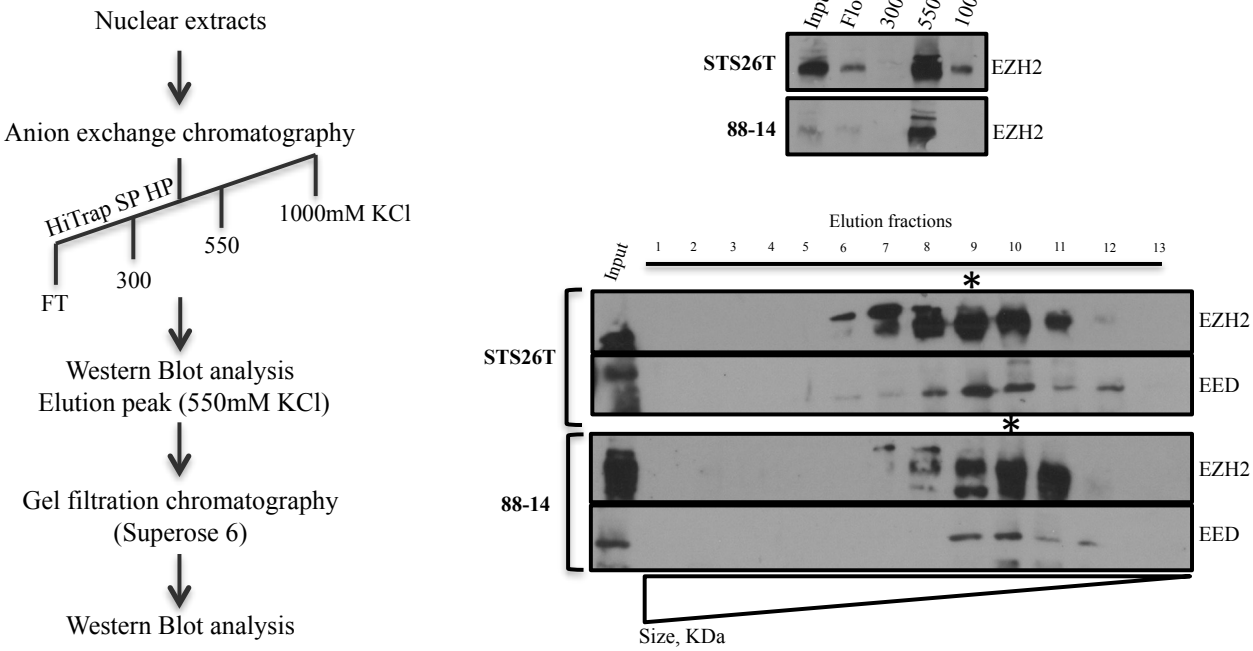
B. Western blot analysis showing *EZH2* knockout efficiency and the impact of SUZ12 rescue on H3K27me2/3.

Figure 4. EZH1 and EZH2 redundancy can explain the absence of their mutations in MPNST. (Experiments in progress)

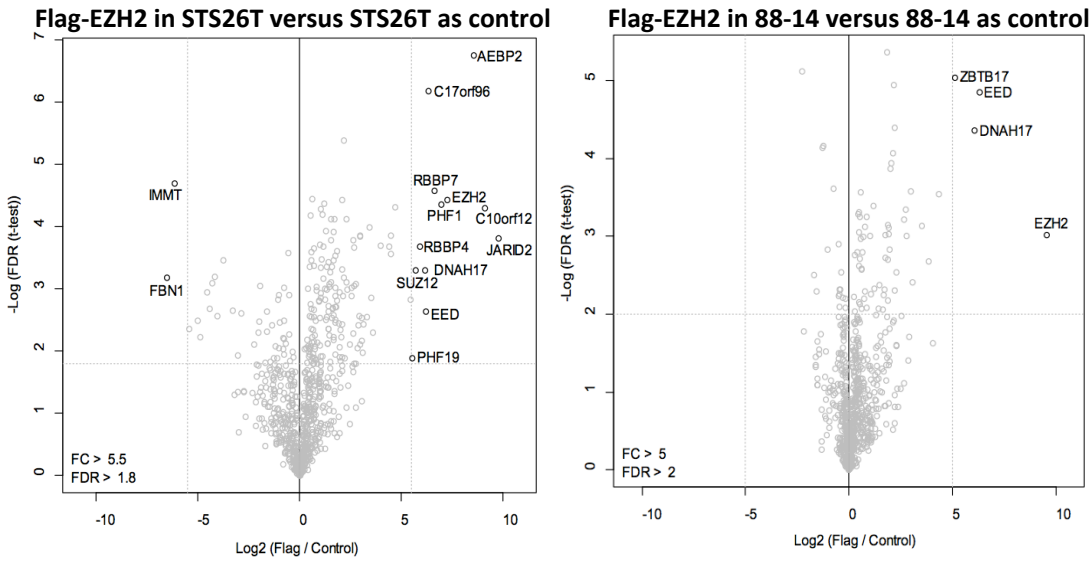
Figures

Figure 1

A



B



C

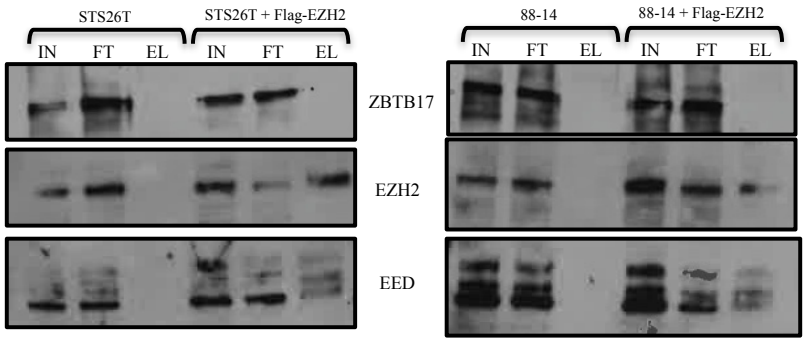
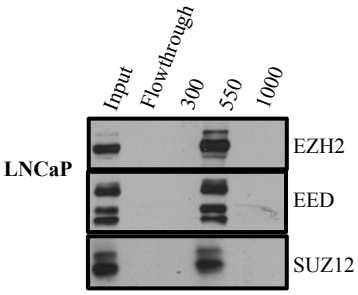
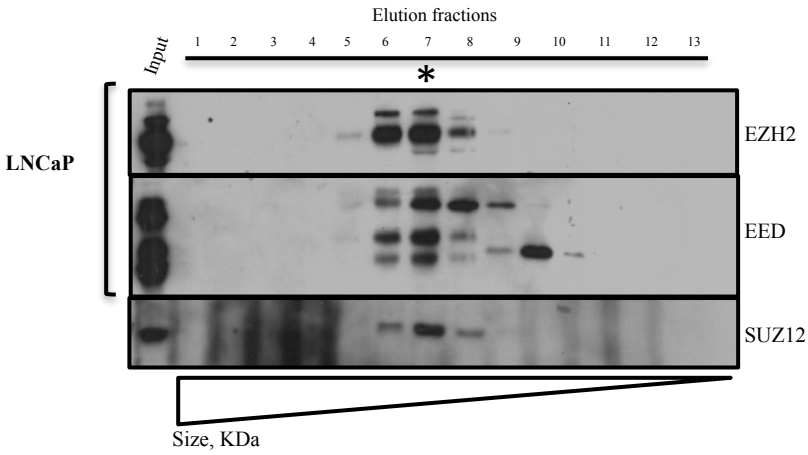


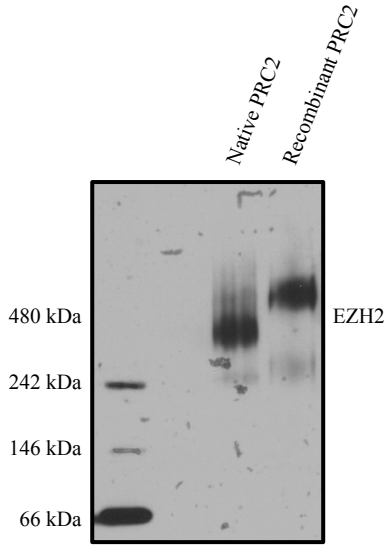
Figure 2

A





B



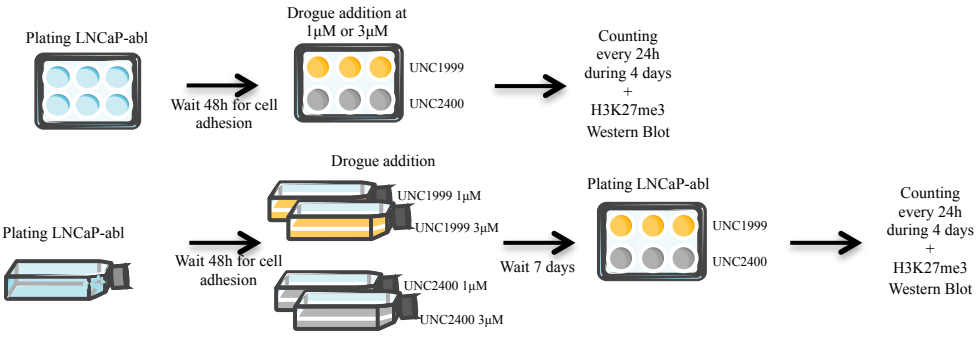
C

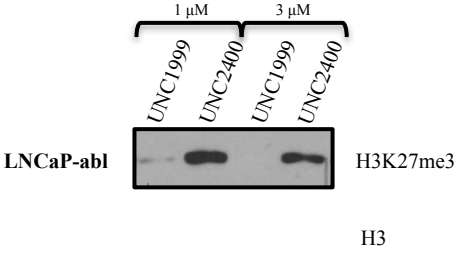
Mass spectrometry

Flag-EZH2 in LNCaP versus LNCaP as control

Experiments in progress

D





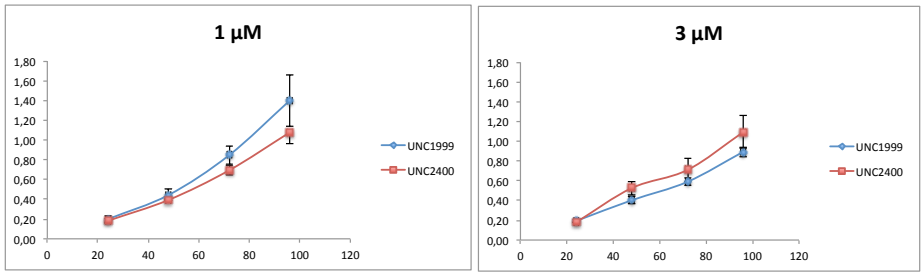
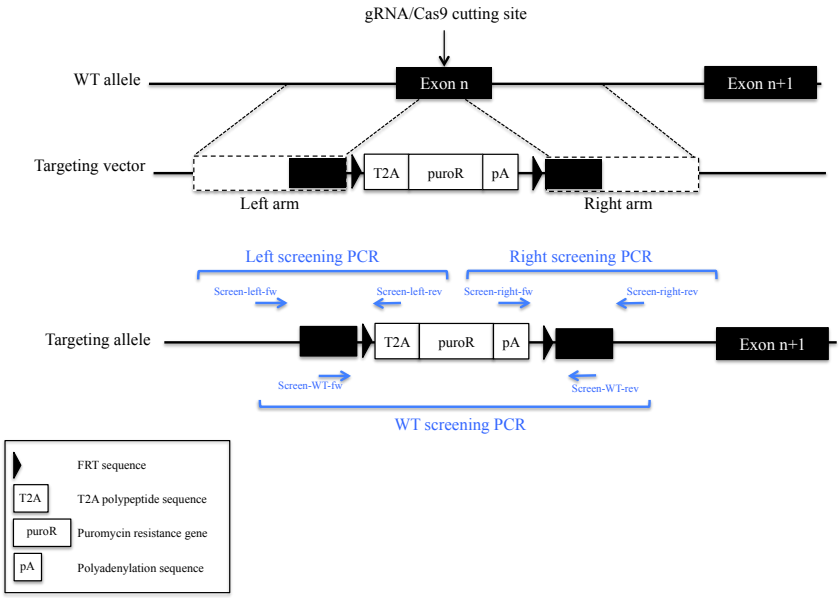
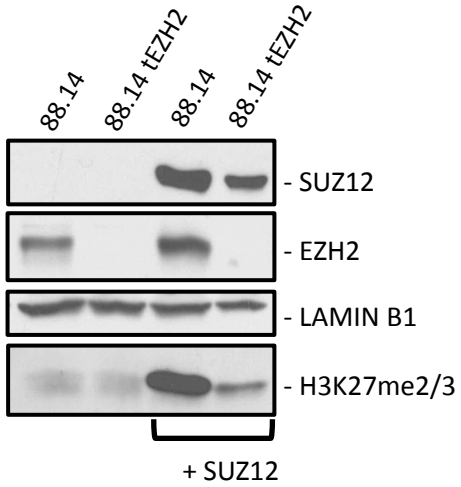


Figure 3

A



B



RNA-seq
88-14 and 88-14_Cl5_tEZH2

Experiments in progress

II-2.6. Supplementary figure legends

Figure S1: Supplementary data relative to Figure 1

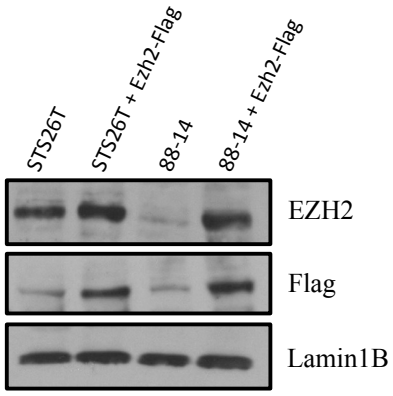
A. Western blot analysis of EZH2, Flag and Lamin1B on WT STS26T, EZH2-Flag-STS26T, WT 88-14 and EZH2-Flag-88-14 nuclear extracts.

B. EZH2/EZH1 relative stoichiometries of PRC2 components in mass spectrometry analysis for STS26T and 88-14 cell lines.

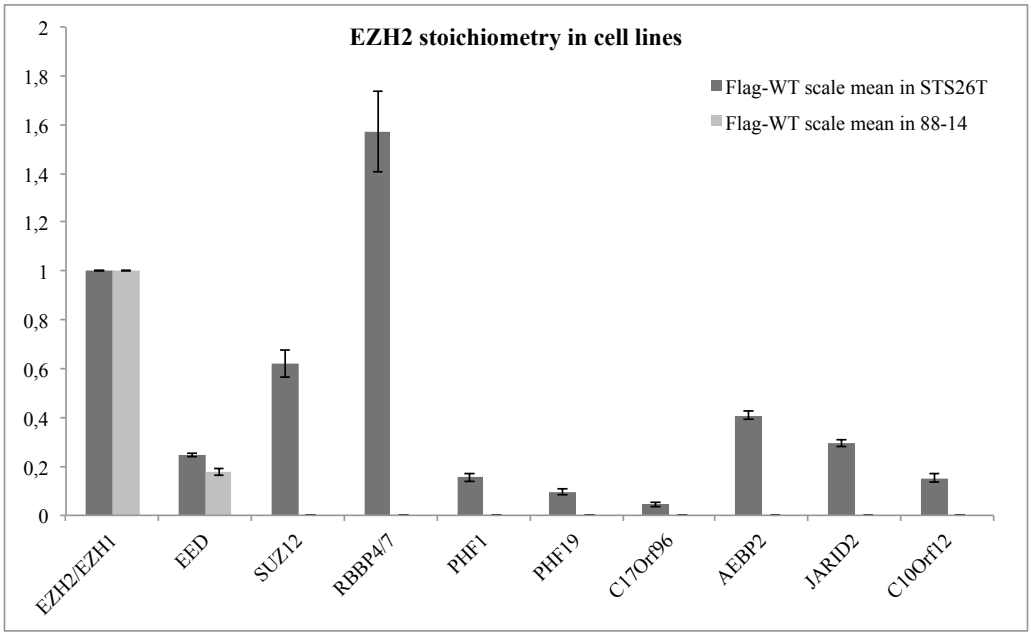
C. Western blot analysis of ZBTB17 and Lamin1B on WT STS26T, EZH2-Flag-STS26T, WT 88-14 and EZH2-Flag-88-14 75µg and 50µg nuclear extracts

Figure S1

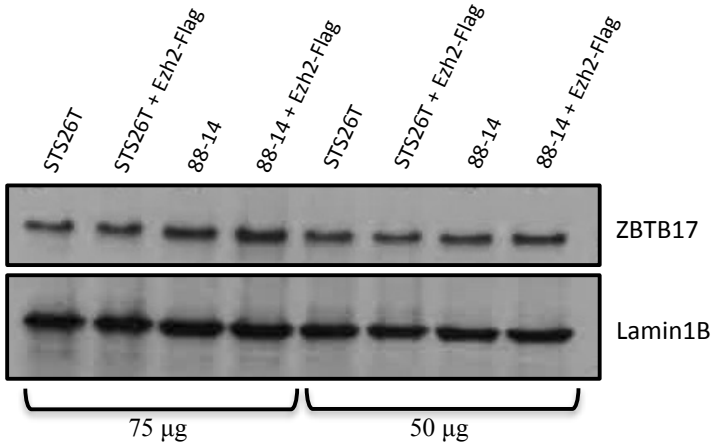
A



B



C



II-2.7. Bibliography

Baymaz HI, Spruijt CG, Vermeulen M. Identifying nuclear protein-protein interactions using GFP affinity purification and SILAC-based quantitative mass spectrometry. *Methods Mol Biol.* 2014;1188:207-26.

Brems H, Beert E, de Ravel T, Legius E. Mechanisms in the pathogenesis of malignant tumours in neurofibromatosis type 1. *Lancet Oncol.* 2009;10(5):508-15. Review.

De Raedt T, Beert E, Pasmant E, Luscan A, Brems H, Ortonne N, Helin K, Hornick JL, Mautner V, Kehrer-Sawatzki H, *et al*. PRC2 loss amplifies Ras-driven transcription and confers sensitivity to BRD4-based therapies. *Nature*. 2014;514(7521):247-51.

Ernst T, Chase AJ, Score J, Hidalgo-Curtis CE, Bryant C, Jones AV, Waghorn K, Zoi K, Ross FM, Reiter A, *et al*. Inactivating mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myeloid disorders. *Nat Genet*. 2010;42(8):722-6.

Ezhkova E, Lien WH, Stokes N, Pasolli HA, Silva JM, Fuchs E. EZH1 and EZH2 cogovern histone H3K27 trimethylation and are essential for hair follicle homeostasis and wound repair. *Genes Dev.* 2011;25(5):485-98.

Hirbe AC, Gutmann DH. Neurofibromatosis type 1: a multidisciplinary approach to care. *Lancet Neurol.* 2014;13(8):834-43. Review.

Jung HY, Jun S, Lee M, Kim HC, Wang X, Ji H, McCrea PD, Park JI. PAF and EZH2 induce Wnt/β-catenin signaling hyperactivation. *Mol Cell.* 2013;52(2):193-205.

Lee ST, Li Z, Wu Z, Aau M, Guan P, Karuturi RK, Liou YC, Yu Q. Context-specific regulation of NF-κB target gene expression by EZH2 in breast cancers. *Mol Cell.* 2011;43(5):798-810.

Lee W, Teckie S, Wiesner T, Ran L, Prieto Granada CN, Lin M, Zhu S, Cao Z, Liang Y, Sboner A, *et al.* PRC2 is recurrently inactivated through EED or SUZ12 loss in malignant peripheral nerve sheath tumors. *Nat Genet*. 2014;46(11):1227-32.

Li X, Gonzalez ME, Toy K, Filzen T, Merajver SD, Kleer CG. Targeted overexpression of EZH2 in the mammary gland disrupts ductal morphogenesis and causes epithelial hyperplasia. *Am J Pathol.* 2009;175(3):1246-54.

Luscan A, Shackleford G, Masliah-Planchon J, Laurendeau I, Ortonne N, Varin J, Lallemand F, Leroy K, Dumaine V, Hivelin M, *et al.* The activation of the WNT signaling pathway is a Hallmark in neurofibromatosis type 1 tumorigenesis. *Clin Cancer Res.* 2014;20(2):358-71.

Margueron R, Li G, Sarma K, Blais A, Zavadil J, Woodcock CL, Dynlacht BD, Reinberg D. Ezh1 and Ezh2 maintain repressive chromatin through different mechanisms. *Mol Cell.* 2008;32(4):503-18.

Margueron R, Reinberg D. The Polycomb complex PRC2 and its mark in life. *Nature.* 2011;469(7330):343-9. Review.

Nikoloski G, Langemeijer SM, Kuiper RP, Knops R, Massop M, Tönnissen ER, van der Heijden A, Scheele TN, Vandenberghe P, de Witte T, *et al*. Somatic mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myelodysplastic syndromes. *Nat Genet*. 2010;42(8):665-7.

Ntziachristos P, Tsirigos A, Van Vlierberghe P, Nedjic J, Trimarchi T, Flaherty MS, Ferres-Marco D, da Ros V, Tang Z, Siegle J, *et al*. Genetic inactivation of the polycomb repressive complex 2 in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat Med*. 2012;18(2):298-301.

Ratner N, Miller SJ. A RASopathy gene commonly mutated in cancer: the neurofibromatosis type 1 tumour suppressor. *Nat Rev Cancer.* 2015;15(5):290-301. Review.

Rauen KA. The RASopathies. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2013;14:355-69. Review.

Shi B, Liang J, Yang X, Wang Y, Zhao Y, Wu H, Sun L, Zhang Y, Chen Y, Li R, *et al.* Integration of estrogen and Wnt signaling circuits by the polycomb group protein EZH2 in breast cancer cells. *Mol Cell Biol.* 2007;27(14):5105-19.

Xu K, Wu ZJ, Groner AC, He HH, Cai C, Lis RT, Wu X, Stack EC, Loda M, Liu T, Xu H, Cato L, Thornton JE, Gregory RI, Morrissey C, Vessella RL, Montironi R, Magi-Galluzzi C, Kantoff PW, Balk SP, Liu XS, Brown M. EZH2 oncogenic activity in castration-resistant prostate cancer cells is Polycomb-independent. *Science.* 2012;338(6113):1465-9.

Zhang J, Ding L, Holmfeldt L, Wu G, Heatley SL, Payne-Turner D, Easton J, Chen X, Wang J, Rusch M, *et al*. The genetic basis of early T-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. *Nature*. 2012;481(7380):157-63.

Zhang M, Wang Y, Jones S, Sausen M, McMahon K, Sharma R, Wang Q, Belzberg AJ, Chaichana K, Gallia GL, *et al*. Somatic mutations of SUZ12 in malignant peripheral nerve sheath tumors. *Nat Genet*. 2014;46(11):1170-2.

II-3. Article 4: Identification des voies de signalisation dérégulées suite à l'inactivation du PRC2 dans les tumeurs NF1 et pouvant être ciblées par des thérapies.

II-3.1. Introduction

Les MPNST sont des sarcomes des gaines des nerfs périphériques métastasant fréquemment et souvent résistants aux chimiothérapies actuelles. Leur survenue est de mauvais pronostic et trop fréquemment d'issue fatale. Ces tumeurs surviennent dans plus de la moitié des cas chez des individus atteints de neurofibromatose de type 1 (NF1) (Hirbe *et al*. 2014). Dans le cadre de la NF1, les MPNST se développent à partir de tumeurs bénignes appelées neurofibromes plexiformes majoritairement constitués de cellules de Schwann présentant une mutation inactivatrice sur chacun des deux allèles du gène *NF1* (Ratner *et al.* 2015). Récemment, des altérations du PRC2 par mutations homozygotes de *SUZ12* et *EED* ont été mises en évidence dans plus de la moitié des MPNST des patients NF1 (De Raedt *et al.* 2014; Lee *et al.* 2014; Zhang *et al.* 2014). En conséquence, ces tumeurs perdent la triméthylation de la lysine 27 de l'histone H3 (H3K27me3), marque chromatinienne déposée par PRC2 et associée au maintient de la répression de l'expression des gènes (Margueron et Reinberg 2011). L'implication du PRC2 dans la tumorigenèse des MPNST ouvre de nouvelles perspectives de stratégies thérapeutiques.

D'une part, les acteurs de la compaction de la chromatine sont des cibles d'approches thérapeutiques de plus en plus considérées en oncologie (Arrowsmith *et al.* 2012). Un grand nombre de molécules modulant la plasticité chromatinienne est en cours de développement. Certains, comme les inhibiteurs d'EZH2, sont actuellement en essai clinique de phase 1 et 2 pour le traitement de patients atteints de lymphomes (McCabe *et al.* 2012). De plus, comme nous l'avons vu dans l'introduction de cette thèse, des létalités synthétiques, impliquant deux régulateurs différents de la chromatine, ont été décrites dans plusieurs types de cellules tumorales (Kim *et al.* 2015 ; Biter *et al.* 2015 ; LeFave *et al.* 2015). L'efficacité de molécules agissant sur des modificateurs de la chromatine est donc une piste à explorer dans un modèle de MPNST inactivé pour le PRC2.

D'autre part, l'identification de voies cellulaires affectées par l'inactivation complète d'un membre du PRC2, qui est un répresseur transcriptionnel, pourrait orienter vers de nouvelles

pistes de traitements. Afin de mettre en évidence les gènes nécessaires sélectivement à la survie des cellules après l'inactivation du PRC2, un crible perte-de-fonction pan-génomique lentiCRISPR (*Clustered regularly interspaced short palindromic repeats- CRISPR associated*) pouvait être envisagé. En effet, la simplicité d'adressage de la nucléase Cas9 pour modifier spécifiquement des *loci* génomiques grâce aux ARN guides a conduit au développement de librairies d'ARN guides permettant le ciblage du génome entier (Shalem *et al.* 2014). Ces librairies sont ensuite intégrées dans des lentivirus capables d'infecter les cellules d'intérêt. Après plusieurs temps de doublement, l'évaluation de la représentativité des ARN guides au sein des cellules infectées par séquençage à haut débit permet notamment d'identifier des gènes essentiels à la survie cellulaire. En effet, les cellules ayant intégrées des ARN guides ciblant des gènes essentiels à la survie meurent au cours du crible. Après plusieurs temps de doublement, ces gènes essentiels peuvent donc être identifiés en mettant en évidence la déplétion des ARN guides les ciblant. Ainsi, les cribles pan-génomiques lentiCRISPR sont des outils innovants ayant fait leurs preuves dans l'identification de gènes essentiels à la survie de cellules cancéreuses (Shalem *et al.* 2014 ; Wang *et al.* 2014 ; Wang *et al*. 2015 ; Toledo *et al.* 2015).

L'obtention d'un modèle cellulaire approprié est cruciale pour l'étude *in vitro* de composés thérapeutiques ou la recherche de nouvelles cibles. A cette fin, nous avons génétiquement inactivé PRC2 dans des cellules de Schwann issues d'un neurofibrome plexiforme de patient NF1. Les lignées isogéniques qui en résultent représentent un outil unique pour l'étude des conséquences spécifiques de la perte du complexe. En effet, il assure la comparaison de cellules d'un même fond génétique et ne différant que par l'inactivation du PRC2. Sur les cellules obtenues, nous avons effectué un crible de composés chimiques épigénétiques ainsi qu'un crible pan-génomique lentiCRIPSR.

II-3.2. Matériels et méthodes

Culture cellulaire

La lignée de cellules de Schwann SPW1 provenant du neurofibrome plexiforme d'un patient NF1 pNF05.5 nous a été donnée par le Professeur Margaret Wallace. Elle présente une mutation germinale dans l'exon 26 de *NF1* c.3456_7insA ; p.Leu1153fs et une LOH somatique. J'ai infecté la lignée SPW1 avec le virus pBABE-hygro-P53DN afin d'obtenir une lignée SPW1 « sauvage » (SPW1 WT) avec un taux de prolifération suffisant pour permettre le génome *éditing*. La lignée de cellule de Schwann SUSA nous a également été donnée par le Professeur Margaret Wallace. Elle dérive d'un nerf périphérique de patient non NF1. Son génotype est $NF1^{+/+}$ et $PRC2^{+/+}$. Ces lignées, SPW1 et SUSA, ont été établies par l'équipe du Professeur Wallace en immortalisant les cellules de Schwann par infection de virus hTERT et $CD4^{R24C}$.

Dans les cellules SPW1 WT, les gènes *SUZ12* ou *EED* ont été inactivés constitutionnellement par génome *éditing* avec le système CRISPR-Cas9. Pour chaque inactivation, deux clones ont été sélectionnés :

- ciblage SUZ12 (tSUZ12) : SPW1 tSUZ12_Cl6 et _Cl11
- ciblage EED (tEED) : SPW1 tEED_Cl16 et _Cl19

Dans les cellules SUSA, les gènes *NF1* et/ou *SUZ12* ou *EED* ont été inactivés constitutionnellement par génome *éditing* avec le système CRISPR-Cas9. Pour chaque inactivation, les clones sélectionnés étaient les suivant:

- SUSA tNF1_Cl21
- SUSA tNF1 tSUZ12_Cl17 et _Cl18
- SUSA tNF1 tEED_Cl6 et _Cl16
- SUSA tSUZ12_ClA7 et _ClA10
- SUSA tEED_ClA3 et _ClA11

Toutes ces cellules de Schwann humaines ont été cultivées à 37°C, à 5% de CO2 en milieu D10 (DMEM complémenté avec 10% de FBS (*Fetal Bovine Serum*)).

Génome éditing ciblé grâce à l'outil CRISPR-Cas9

- Principe

L'outil génétique CRISPR-Cas9 permet l'adressage de l'endonucléase bactérienne Cas9 à une séquence spécifique d'ADN grâce à un ARN guide simple brin (ARNgs) complémentaire de la séquence cible. Une fois recrutée, la Cas9 crée une cassure double brin de l'ADN au niveau du *locus* ciblé. La cellule peut alors mettre en place deux mécanismes de réparation de cette cassure: la recombinaision non homologue *NHEJ* (*Non-Homologous End-Joining)* et la recombinaison homologue HDR (*Homology-Directed Repair)*. La NHEJ entraîne des insertions ou délétions de taille variable qui peuvent altérer le cadre de lecture de la séquence codante. La réparation par HDR peut être utilisée pour introduire des mutations ponctuelles spécifiques ou des séquences bien déterminées par l'apport d'une matrice homologue à la séquence cible (Figure 52).

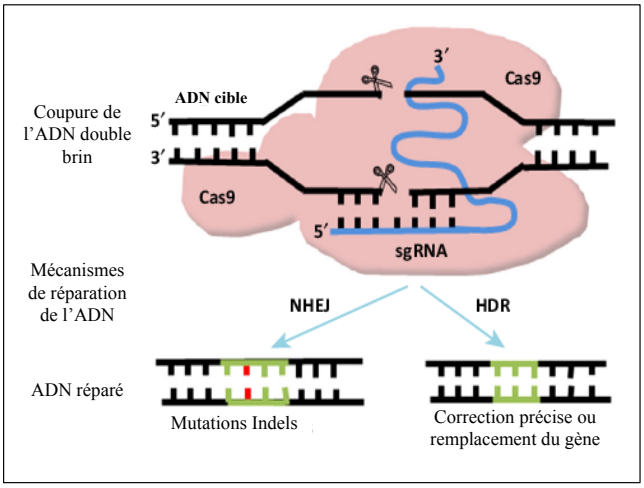


Figure 52. Mécanisme du génome *éditing* par CRISPR-Cas9.
L'enzyme Cas9 (en rose) induit une cassure double brin de l'ADN au locus d'intérêt grâce à l'ARNgs (en bleu). La cellule répare l'ADN par NHEJ ou HDR. Les lignes vertes représentent la séquence d'ADN réparée et la ligne rouge représente les mutations indels générées par NHEJ.
D'après Lu *et al.* 2015.

La stratégie de ciblage d'exon établie au laboratoire favorise la réparation par HDR en transfectant dans la cellule un vecteur de ciblage, en plus de Cas9 et de l'ARNgs. Entre les bras d'homologies permettant la recombinaison homologue, le vecteur de ciblage contient une casette STOP composée d'une séquence T2A, d'un gène de résistance à un antibiotique (ATB) et d'une séquence polyA. Seule l'insertion de cette cassette de ciblage dans la même phase de lecture que la séquence codante du gène à cibler permet l'expression du gène de résistance (Figure 53).

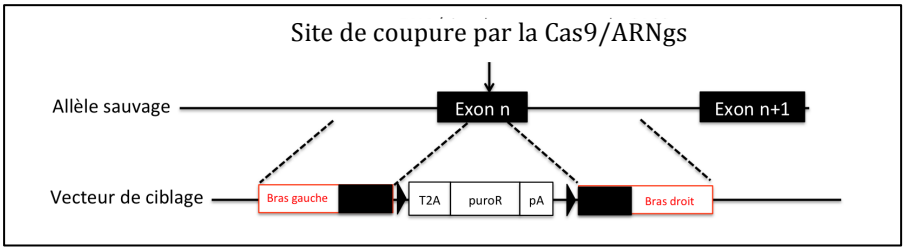


Figure 53. Schéma du principe du ciblage d'exon.
La cassette du vecteur de ciblage contient une séquence T2A permettant la génération de deux protéines à partir d'un même transcrit, un gène de résistance à un ATB (ici la puromycine = puroR) et une séquence de polyadénylation (polyA) qui induit une terminaison de la transcription.

- Design in silico

Pour chacun des gènes d'intérêt, *SUZ12*, *EED* et *NF1* un exon a été choisit comme cible avec différents critères incluant sa taille, le fait qu'il soit constitutionnel et le plus N-terminal possible. Les ARNgs ont été choisis en utilisant l'interface web http://crispor.tefor.net/crispor.cgi. Les différents oligonucléotides de PCR ont été dessinés comme sur la figure 54 grâce à l'outil en ligne Primer-BLAST du NCBI.

- Construction et clonage des vecteurs

Le vecteur de clonage porteur de l'ARNgs et le vecteur de ciblage ont été construits et transformés dans des bactéries compétentes commerciales (*DG1 chemically competent bacteria,* Eurogentec). Des midipreps des différentes constructions ont été réalisées (Kit Macherey-Nagel).

- Transfections des lignées cellulaires

Les constructions plasmidiques ARNgs, vecteur de ciblage et Cas9 ont été transfectées dans les différentes lignées cellulaires en boite de 10 cm grâce au réactif PEI (Polyethylenimine)/Tampon Hepes selon les proportions suivantes :

	SPW1	SUSA
ADN (µg)	30	60
PEI (µl)	90	90

- Sélection et repiquage des clones

Les cellules ayant intégré la construction de ciblage ont été sélectionnées par résistance aux ATB 72h après transfection. Les clones sélectionnés ont ensuite été repiqués en plaque 96 puits. Les ATB utilisés ainsi que leurs concentrations sont reportées ci-après :

	SPW1	SUSA
ATB (concentration)	Néomycine (300 µg/ml)	Puromycine (0.5 µg/ml) Hygromycine (0,17 µg/µl)

- Expansion et analyse clonale par génotypage et Western Blot

Après expansion clonale, l'ADN génomique des clones a été extrait. Le génotypage des clones a été réalisé : deux PCR appelées « PCR bras gauche » et « PCR bras droit » ont permis de vérifier l'insertion de la construction de ciblage au locus d'intérêt (Figure 54). Une troisième PCR appelée « PCR allèle sauvage » a permis de savoir si les deux allèles du gène étaient ciblés. Si un seul allèle était ciblé, l'allèle sauvage était séquencé pour vérifier son inactivation par délétion ou insertion aléatoire de nucléotides modifiant la phase ouverte de lecture.

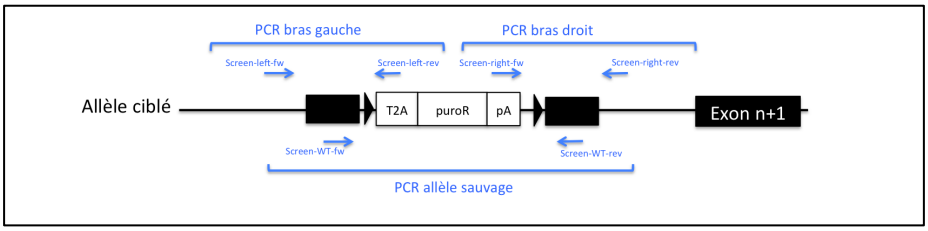


Figure 54. Schéma des PCR de génotypage des clones ciblés.
Trois PCR de génotypage des clones étaient réalisées : la PCR bras gauche, la PCR bras droit et la PCR allèle sauvage. La position des *primers* de PCR est indiquée en bleu sur le schéma.

Pour les clones sélectionnés, des extraits nucléaires ont été préparés et des Western Blots ont été effectués pour vérifier l'inactivation au niveau protéique.

Préparation d'extraits nucléaires

Pour l'obtention d'extraits nucléaires, les culots cellulaires ont été incubés dans du tampon A (10mM Hepes pH 7.9, 2.5mM MgCl2, 0.25M sucrose, 0.1% NP40, 0.5mM DTT, 1mM PSMF) 10 min dans la glace, centrifugés à 8000 rpm 10 min, resuspendus dans du tampon B (25mM Hepes pH 7.9, 1.5mM MgCl2, 700 mM NaCl, 0.5mM DTT, 0.1 mM EDTA, 20% glycerol), soniqués puis centrifugés à 14000 rpm 15min. La fraction nucléaire était contenue dans le surnageant recueilli. La concentration protéique de ces extraits nucléaires a été quantifiée par mesure de l'absorbance après un essai de Bradford.

Western Blot

Les différents anticorps utilisés pour le Western Blot étaient les suivants :

Anticorps	Dilution	Espèce	Provenance
EZH2	1/3000	Lapin	Margueron *et al.* 2008
EED	1/1000	Lapin	Margueron *et al.* 2008
SUZ12	1/1000	Lapin	Margueron *et al.* 2008
H3K27me2/3	1/3000	Souris	Margueron *et al.* 2008
NF1	1/1000	Lapin	Santa Cruz (sc-67)
LaminB1	1/3000	Lapin	Abcam (ab16048)

Caractérisation des modèles générés

Ploïdie

La ploïdie des cellules a été suivie en cytométrie en flux (NovoCyte®, ACEA Biosciences Inc.) par l'analyse du cycle cellulaire avec l'Iodure de Propidium (ThermoFischer).

CGH-array

Sur les cellules SUSA, SPW1 WT et tSUZ12_Cl6 et _Cl11, une CGH-*array* pangénomique de format 400K (Agilent® Technologies) a été réalisée à la recherche de remaniements génomiques (plateforme de CGH-*array* de l'hôpital Saint-Louis). L'analyse des variations de nombres de copies par rapport à un pool témoin a été effectuée sur le logiciel CytoGenomics d'Agilent® Technologies.

Tests cellulaires in vitro des cellules SPW1 WT et tSUZ12 Cl6 et Cl11

Test de prolifération

24h après ensemencement de 250 000 cellules par puits de plaque 6 puits, les cellules étaient comptées tous les jours pendant 4 jours après marquage au bleu de trypan (Invitrogen). Les comptages ont été réalisés en duplicats et répétés trois fois.

Essai de viabilité cellulaire

Une estimation de la prolifération et de la viabilité cellulaires a été réalisé grâce à un test WST-1 (Roche) selon les recommandations du fabriquant.

Essai de migration cellulaire

La migration cellulaire a été estimé par un test IBIDI® (Biovalley) selon les recommandations du fabriquant. Un insert a été placé dans le puits de culture. Le nombre de cellules présentes dans l'espace vacant a été compté 6h après le retrait de l'insert.

Apoptose

Une analyse par cytométrie en flux a permis la mesure des marqueurs apoptotiques annexin 5 et 7-AAD avant et après induction de l'apoptose par l'ajout de 0,1 µM et 0,5 µM de staurosporine.

RNA-seq

Préparation des échantillons et contrôle qualité

Les cellules SPW1 WT, Cl6 et Cl11 ont été ensemencées de façon à atteindre 80% de confluence 48h après ensemencement. Leur ARN total a été extrait en Trizol et quantifié au Bioanalyzer (Agilent Technologies). Des duplicats ont été récoltés pour chaque type cellulaire.

Séquençage de l'ARN et analyse

Les ARN isolés ont été envoyés à la plateforme de séquençage haut-débit de l'Institut Curie. Après reverse transcription, les ADNc ont été séquencés sur un Illumina HiSeq-2500 générant des *reads paired-end* de 100pb. Un minimum de 21 millions de reads par échantillons a été généré. Après excision des adaptateurs, les séquences ont été alignées sur le génome humain de référence (hg38) en utilisant STAR_2.5.0a (Dobin *et al.* 2013). Le niveau d'expression des gènes était quantifié par HTSeq-count (Anders *et al.* 2014) et normalisé par DESeq (Anders *et*

al. 2010). D'autre part, les fragments normalisés par rapport à la taille des gènes FPKM (Fragments Per Kilobase Of Exon Per Million Fragments Mapped) ont été obtenus grâce à la fonction FPKM du package R edgeR. Les analyses en composante principale et les clustering hiérarchiques (Corrélation de Pearson, Ward D) ont été réalisées à partir des tables de comptages brutes et des FPKM. DESeq a permis également d'identifier les gènes différentiellement exprimés (GDE) entre les cellules mutantes et contrôles. Les gènes surexprimés ont été définis par un log(fold-change) > 1 et une p_{value} ajustée < 0,05. L'analyse ontologique des gènes surexprimés a été réalisée grâce à l'outil DAVID (Huang da *et al.* 2009). La liste des gènes surexprimés dans les cellules SPW1 mutées par rapport aux cellules SPW1 contrôles a ensuite été comparée à la liste des gènes surexprimés dans les MPNST mutées identifiées par Lee *et al.* 2014. Le nombre de FPKM des gènes surexprimés communs a été vérifié afin d'écarter ceux présentant des FPKM < 1.

ChIP-seq H3K27me3

Préparation des échantillons

Le ChIP-seq H3K27me3 a été réalisé comme précédemment décrit (Wassef *et al.* 2015). Brièvement, des cellules ont été étalées afin d'atteindre 80% de confluence le jour de la récolte. Les billes magnétiques Dynabeads couplées à la Protéine A (Invitrogen) ont été utilisées pour l'immunoprécipitation de 5µg de chromatine pour chaque échantillon. Une sonication a été réalisée afin d'obtenir des fragments d'une taille moyenne de 300 pb. La librairie a été préparée selon les recommandations du fabriquant par la plateforme de séquençage haut-débit de l'Institut Curie (TruSeq ChIP sample preparation kit, Illumina). Le séquençage haut-débit est en cours de réalisation sur un Illumina Hi-Seq 2500.

Crible chimique avec la librairie de cibles épigénétiques du SGC (Structural Genomics Consortium) (Brown et Müller, 2015)

Le SGC a établi une librairie d'inhibiteurs provenant de plus de dix compagnies pharmaceutiques différentes. Cette librairie est en libre accès et comprend un set de 36 inhibiteurs de cibles épigénétiques. Ces molécules partagent les propriétés communes suivantes :

- IC50 (inhibiteurs) ou Kd (antagonistes) < 100nM
- une sélectivité > 30
- une activité significative sur les cellules < 1 µM
- une structure cristallographique du ligand et de la protéine connue à une résolution > 2,8A
- une accessibilité à la communauté scientifique sans restriction d'utilisation.

La nature de ces inhibiteurs, leurs cibles et les doses testées sont listées dans le tableau X.

Tableau X. Listes des inhibiteurs du SGC, de leurs cibles et des doses testées sur les SPW1 WT et tSUZ12 Cl6.

Composé	Cible	Dose minimale d'inhibition significative (concentration µM)	Dose maximale recommandée (concentration µM)
GSK2801	BAZ2A/B	1	10
BAZ2-ICR	BAZ2A/B	1	5
JQ1	BET (BRD2, BRD3, BRD4, BRDT)	1	1
PFI-1	BET (BRD2, BRD3, BRD4, BRDT)	1	10
LP99	BRD7, BRD9	1	10
BI-9564	BRD9/7	1	10
I-BRD9	BRD9	1	5

OF-1	BRPF1, BRPF2, BRPF3	1	5
NI-57	BRPF1, BRPF2, BRPF3	1	5
PFI-4	BRPF1B	1	5
SGCCBP30	CBP, EP300 bromo	1	3
ICBP112	CBP, EP300 bromo	1	5
NVS-CECR2-1	CECR2	1	1
SGC0946	Dot1L	1	10
UNC1999	EZH2, EZH1	3	5
GSK343	EZH2, EZH1	3	5
UNC0638	G9a, EHMT1	1	5
UNC0642	G9a, EHMT1	1	5
A366	G9a, EHMT1	1	5
GSK J4	JMJD3, UTX, JARID1B	5	10
UNC1215	L3MBTL3	1	5
GSKLSD1	LSD1	1	1
GSK484	PAD4	10	10
IOX2	PHD2	250	250
MS023	PRMT type I	1	10
MS049	PRMT4/6	5	10
SGC 707	PRMT3	1	10
GSK591	PRMT5	1	5
PFI-2	SETD7	1	10
PFI-3	Smarca2 Smarca4, PB1	1	10
LLY-507	SMYD2	1	10
BAY598	SMYD2	1	10
A-196	SUV420H1/2	1	10
OICR-9429	WDR5	3	5
IOX1	pan-demethylase (2OG dependent)	50	50
Bromosporine	pan-bromodomain	5	5

Cette librairie a été testée en parallèle sur les lignées SPW1 WT et tSUZ12 Cl6. 2000 cellules ont été étalées dans des plaques 96-puits 24h avant l'ajout des drogues. Comme recommandé, les cellules restaient 7 jours en présence d'inhibiteurs avant la réalisation du test de luminescence CellTiter-Glo® (Promega). Ce test a permis l'estimation du nombre de cellules viables par quantification de l'ATP cellulaire, reflet de l'activité métabolique.

Dans un premier temps, pour chacune des 36 molécules, la dose minimale efficace et la dose maximale conseillée par le SGC ont été testées. La survie cellulaire était normalisée par rapport à un contrôle traité en DMSO. Toutes les drogues n'entrainant pas plus de 20% de mortalité d'au moins un des échantillons et avec au moins une des doses, ont été considérées sans effet. Pour les drogues ayant un effet sur la survie cellulaire, un ratio de survie WT/Cl6 a été calculé. Seules les drogues présentant un ratio de survie WT/Cl6 >1 pour la dose minimale et la dose maximale ont été retenues. Pour les trois drogues remplissant ces critères, des courbes Effet/Dose ont été réalisées en traitant les cellules avec sept doses différentes d'inhibiteurs. Les inhibiteurs GSK591 et Olaparib ont enfin été testés sur deux clones indépendants de SPW1 tSUZ12 en les comparant à deux clones indépendants de SPW1 WT aux vitesses de prolifération comparables.

Crible *pan-génomique CRISPR*

Un crible pan-génomique lentiCRISPR a été réalisé en parallèle sur les SPW1 WT et les SPW1 tSUZ12 Cl6 (Figure 55). Le crible a été réalisé deux fois à deux temps différents.

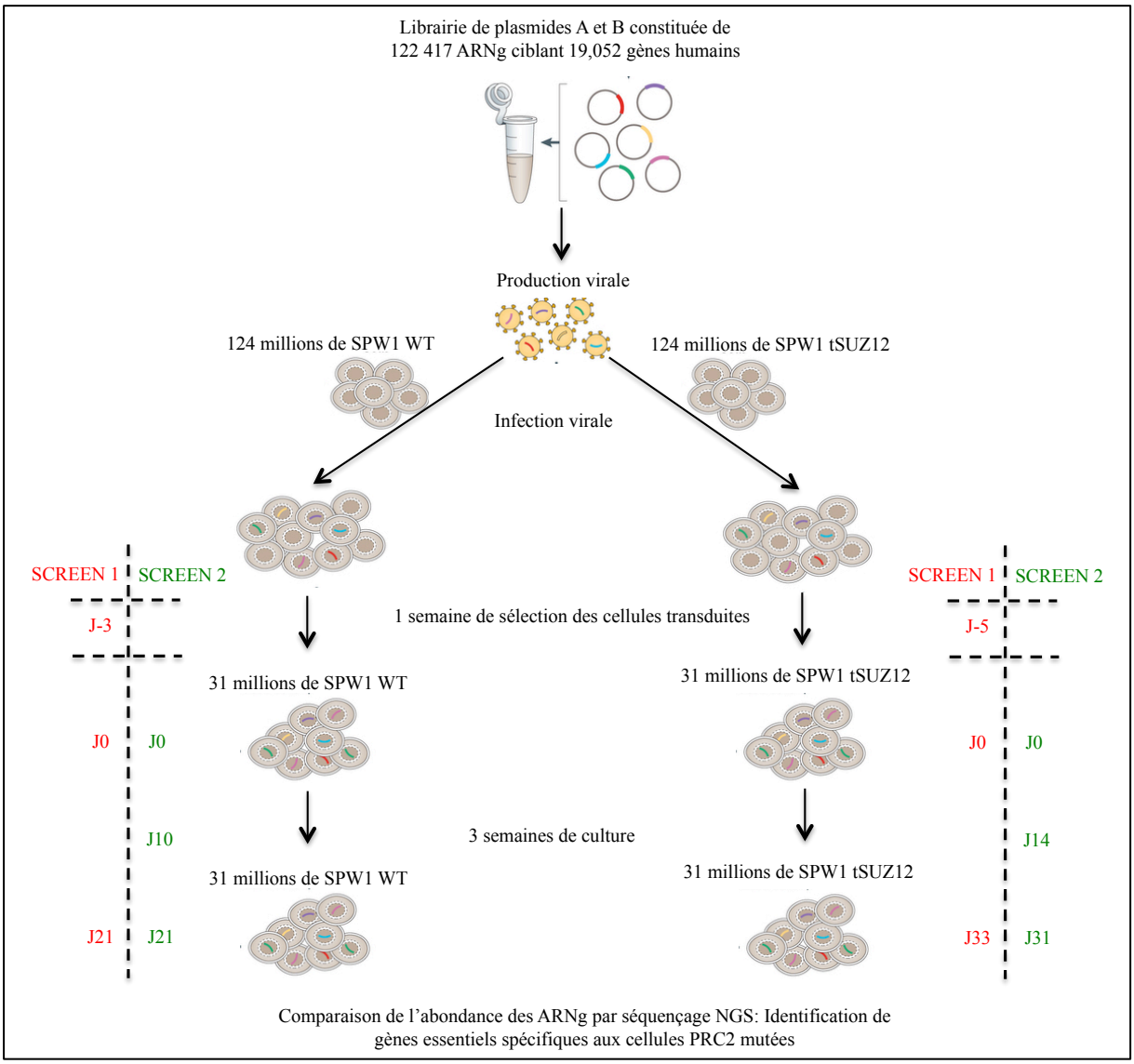


Figure 55. Principe du crible pan-génomique CRISPR-Cas9.
Afin de comparer les échantillons à des temps de doublement équivalent, les ADN des SPW1 WT et Cl6 ont été récoltés à des temps différents. Au cours du premier crible, les ADN des cellules SPW1 WT ont été récoltés à J-3, J0 et J21 et les ADN des cellules SPW1 Cl6 ont été récoltés à J-5, J0 et J33. Au cours du deuxième crible, les ADN des cellules SPW1 WT ont été récoltés à J0, J10 et J21 et les ADN des cellules SPW1 Cl6 ont été récoltés à J0, J14 et J31. D'après Shalem *et al.* 2014.

Acquisition de la librairie et amplification

La librairie humaine pan-génomique GeCKO (*Genome-scale CRISPR-Cas9 KnockOut*) V2 constituée de 122 417 ARN guides simples brins (ARNgs) ciblant 19 052 gènes et incluant 1000 ARNgs témoins a été achetée chez Addgene (ID 1000000048). La librairie se compose de deux pools différents : pool A et pool B. Chaque pool contient 3 ARNgs ciblant le même gène. Au total chaque gène est donc ciblé par 6 ARNgs différents. Les ARNgs sont exprimés à partir d'un plasmide unique exprimant également Cas9 ainsi que le gène de résistance à la puromycine.

L'amplification de la librairie a été réalisée selon les recommandations du fournisseur. Brièvement, les pools A et B ont été amplifiés séparément. Pour chacun, quatre électroporations successives dans des bactéries électro-compétentes Endura™ Lucigen (ref #60242) ont été réalisées sur un E coli Pulser™ (BioRad). Afin de ne pas perdre la représentativité, 8 ml de mix de transformations par pool ont été étalés sur des 15 boites de pétri (143 cm2) en présence d'ampicilline et incubés 14h à 30°C. Les colonies ont ensuite été récupérées, mélangées et culotées avant l'extraction de l'ADN plasmidique sur kit Endotoxin-Plasmid Maxiprep (Qiagen).

Production lentivirale

Deux productions virales différentes ont été réalisées à des temps différents pour récolter deux lots de virus. Pour produire les lentivirus, une transfection transitoire des HEK293T avec l'ADN plasmidique de la librairie GeCKO lentiCRIPSR et les plasmides d'enveloppe a été réalisée à l'aide du réactif TransIT™ (Mirus) selon les recommandations du fabriquant. La veille de la transfection, 20 millions de cellules HEK293 ont été étalées dans une flasque T150 contenant 39,4ml de milieu D10 (DMEM complémenté avec 10% de sérum de veau foetal). Le jour de la transfection, 38 µg d'ADN réparti en 8,5 µg d'ADN plasmidique GeCKO du pool A et 8,5µg d'ADN plasmidique GeCKO pool B, 8,5 µg de pCMV-VSVg et 12,7 µg de PAX2 ont été ajoutés à 3,8ml du mélange OptiMEM™ + 1%FBS. 114µl de réactif TransIT™ a ensuite été rajouté au mélange. Après une incubation de 30min à température ambiante, le mix contenant les complexes d'ADN a été mis sur les cellules. Deux flasques T150 ont été réalisées en parallèle pour chacune des deux productions virales.

Le surnageant contenant le virus fut récolté 48h et 72h après transfection et centrifugé à 1000rpm 5min pour éliminer les débris. Les surnageants ont été poolés et concentrés sur filtres Amicon Ultra-15 Centrifµgal Filter 100K™ (Millipore) en centrifugeant 2000rpm environ 30min. 1 ml de surnageant concentré fut récupéré et des aliquots de 200 µl ont été congelés à -80°C.

Titration virale

Les cellules SPW1 p53DD WT et tSUZ12 Cl6 ont été infectées en parallèle par spinfection. Deux réplicats pour chacune des conditions ont été réalisés successivement avec les deux lots différents de virus. Chaque lot de virus a été titré indépendamment sur les cellules WT et Cl6 comme suit.

2,5 millions de WT et Cl6 ont été étalées dans chaque puits d'une plaque 12 puits complémenté avec 1ml de milieu D10 + P/S et 8 µg/ml de polybrène. Chaque puits recevait un volume différent de virus de 0 à 90 µl. Après 1h d'incubation à 37°C, les plaques étaient centrifugées à 1000 rpm, 37°C pendant 1h30. 3H30 après la fin de la centrifugation, le milieu était remplacé par 1ml de milieu frais sans polybrène. Le lendemain, les cellules de chaque puits étaient récupérées, comptées et réparties en duplicats de 120 000 cellules par puits pour les WT et 125 000 cellules par puits pour les Cl6 dans des plaques 6 puits. Le jour d'après, 0,65 mg/ml de puromycine était ajoutée sur un de chacun des duplicats. Trois jours après addition de la puromycine, les cellules étaient récoltées et comptées afin d'estimer un pourcentage de transduction. Le pourcentage de cellules transduites était calculé de la façon suivante :

$$\% \text{ de cellules transduites} = \frac{\text{nombre de cellules d'un réplicat avec puromycine}}{\text{nombre de cellules du même réplicat sans puromycine}} * 100$$

Comme précédemment décrit, le volume de virus permettant de se rapprocher d'une MOI (*Multiplicity Of Infection*) de 0,3 a été choisi afin de minimiser le nombre de cellules multi-infectées.

Transduction cellulaire

Pour chaque condition, une couverture de 250X a été choisie, ce qui signifiait que chaque ARNgs était présent en moyenne dans 250 cellules.
124 millions de cellules SPW1 p53DD WT et tSUZ12 Cl6 ont donc été infectées comme précédemment décrit en plaque de 12 puis avec 2,5 millions de cellules par puits. Le lendemain de l'infection, les cellules ont été poolées dans des flasques T875 multi-étages (BD-Biosciences). La puromycine a été ajoutée 48h post-infection et maintenue pendant 7 jours. Les cellules ont été passées ensuite tous les 3 à 4 jours pendant 21 jours pour les WT et 31 jours pour les Cl6 correspondant à environ 28 temps de doublement. A chaque passage, un culot de 31 millions de cellules était congelé pour l'extraction d'ADN génomique, 31 millions d'autres cellules étaient congelées et un minimum de 31 millions de cellules étaient remises en culture afin de maintenir toujours la représentativité de la librairie.

Extraction d'ADN génomique (ADNg)

L'ADNg a été extrait à partir des culots cellulaires congelés selon un protocole adapté au laboratoire. Le tampon de lyse 10X était préparé comme suit :

	Pour 100 mL	Masse molaire	A dissoudre dans 1 L (solution 1M)
$(NH_4)_2 SO_4$ 1M	16 mL	132,14 g/mol	132,14 g
Tris HCl pH 8.8 1M	67 mL	157,60 g/mol	157,60 g
H_2O	17 mL		

Chaque culot recevait 500µl de mix de tampon de lyse dilué 1X (50µl de tampon de lyse 10X, 25µl de Tween-20 10%, 2,5µl de protéinase K et 422,5µl d'eau) et était incubé pendant la nuit à 55°C. Le lendemain, après inactivation de la protéinase K 5 min à 95°C, la RNAse était ajoutée et incubée 1h30 à 55°C. Une extraction phénol/chloroforme/NaCl était ensuite réalisée.

PCR et séquençage

La couverture choisie étant de 250X, 202µg d'ADNg par échantillon devait être séquencé (en admettant qu'1 million de cellules possède 6,6µg d'ADNg). Pour chaque échantillon, 21 réactions de PCR différentes avec 10µg d'ADNg ont été réalisées en utilisant l'enzyme Herculase II Fusion DNA Polymerase (Agilent). La séquence des primers pour amplifier les ARNg lentiCRISPR était les suivantes :
v2Adaptor_F : AATGGACTATCATATGCTTACCGTAACTTGAAAGTATTTCG
v2Adaptor_R : TCTACTATTCTTTCCCCTGCACTGTtgtgggcgatgtgcgctctg

Après vérification des réactions de PCR sur gel, ces échantillons étaient envoyés pour le séquençage haut-débit à Roberto Bonasio, Perelman School of medecine, Université de Pensylvanie.

II-3.3. Résultats

Génération de modèles de cellules de Schwann humaines isogéniques sauvages ou mutées pour le PRC2.

Afin d'obtenir des modèles isogéniques *in vitro* permettant l'étude des conséquences de la perte de fonction du PRC2 dans les cellules de Schwann, nous avons génétiquement inactivé PRC2 dans deux types cellulaires d'origine différente.
Une lignée de cellules de Schwann SPW1 dérivée à partir d'un neurofibrome plexiforme d'un patient NF1 semblait le modèle le plus approprié. De par son origine, la lignée SPW1 présente une mutation inactivatrice sur chacun des deux allèles du gène *NF1*. Dans ces cellules SPW1, les gènes *SUZ12* ou *EED* ont été inactivés constitutivement par une stratégie de ciblage d'exon avec le système CRISPR-Cas9. La perte d'expression protéique ainsi que la disparition d'H3K27me3 consécutive à ces *knockout* ont été vérifiées par Western blot. Pour chaque inactivation, deux clones indépendants ont été sélectionnés (Figure 1A). Afin d'étudier plus en détail l'interaction entre NF1 et le PRC2, nous avons utilisé une seconde lignée de cellules de Schwann, appelée SUSA, dérivée d'un nerf périphérique de patient non NF1. Dans ces cellules au génotype $NF1^{+/+}$ et $PRC2^{+/+}$, nous avons inactivé les gènes *SUZ12* ou *EED* d'une part et, d'autre part, de façon séquentielle les gènes *NF1* puis *SUZ12* ou *EED* par CRISP-Cas9. Comme précédemment, le succès des ciblages a été validé par Western Blot (Figure 1A).

Il est bien établit qu'un certain temps de culture cellulaire favorise la survenue d'anomalies de ploïdie des cellules ainsi que de remaniements chromosomiques. Le ciblage d'exon par CRISPR-Cas9 nécessite de garder les cellules en culture pendant quelques semaines. L'absence de modification de la ploïdie est critique pour le crible lentiCRISPR. Nous avons donc vérifié la constance de la diploïde des SPW1 WT et de ses clones dérivés (Figure 1B).

Par ailleurs, la connaissance des remaniements génomiques potentiels dans les cellules SPW1 est d'une grande aide pour l'interprétation du crible lentiCRISPR. Une CGH-*array* a donc été réalisée afin de mettre en évidence de tels remaniements (Figure 1C). Comme attendu, une délétion emportant les gènes *NF1* et *SUZ12* a été retrouvée dans les cellules SPW1 WT et ses clones dérivés (Figure 1C et D). De plus, trois petites délétions étaient communes aux trois

types cellulaires. Dans les cellules SPW1 tSUZ12_Cl6, une délétion focale aux gènes *LRP1B* (*LDL receptor related protein 1B*) et *STARD13* (*StAR related lipid transfer domain containing 13*) a été identifiée. Enfin, une grande délétion de 21,5 mégabases était spécifiquement présente dans les lignées SPW1_Cl11.

Changements transcriptomiques en réponse à l'inactivation de PRC2.

La perte de fonction du PRC2 conduit à la perte de la marque H3K27me3, qui est une marque chromatinienne associée à la répression des gènes. Les conséquences transcriptomiques de l'inactivation de *SUZ12* dans deux clones indépendants de SPW1 ont été explorées par l'étude du RNA-seq. L'analyse en composantes principales (Figure 2A) et le *clustering* hiérarchique (Figure 2B) des échantillons montraient, comme attendu, une similarité transcriptomique des clones mutés permettant nettement de les distinguer des SPW1 WT.

Les gènes différentiellement exprimés (GDE) entre SPW1 tSUZ12_Cl6 et _Cl11 et SPW1 WT ont été définis comme ceux présentant un log(fold-change) > 1 et une p_{value} ajustée < 0,05 (gènes surexprimés) ou un log(fold-change) < -1 et une p_{value} ajustée < 0,05 (gènes sous-exprimés). L'analyse d'expression différentielle ne prenant pas en compte le niveau d'expression des gènes, nous avons regardé pour chaque gène, son niveau d'expression normalisée (FPKM) dans les cellules WT et mutées (Figure 2C). Les gènes avec un FPKM <1 étaient écartés. En accord avec le rôle de répresseur transcriptionnel du PRC2, la majorité des GDE était surexprimée dans les clones mutés SUZ12 (Figure 2C).

SPW1 tSUZ12_Cl6 et SPW1 WT ont été comparés aux GDE entre SPW1 tSUZ12_Cl11 et SPW1 WT. Le croisement des gènes surexprimés dans chacun des clones mutés SUZ12 par rapport à SPW1 WT a permis d'identifier 1363 gènes surexprimés en conséquence de la mutation de *SUZ12* (Figure 2D).

L'étude de l'ontologie de ces gènes spécifiquement surexprimés dans les cellules mutées SUZ12 montrait un enrichissement important pour des cibles connues du PRC2, parmi lesquels figuraient les facteurs de transcription homéotiques et les gènes impliqués dans le développement et la morphogenèse. Un enrichissement particulier pour les gènes impliqués dans la différentiation et le développement neuronal était également observé (Figure 2E).

Précédemment, Lee *et al* avaient isolé une liste de 479 gènes spécifiquement surexprimés dans des MPNST mutés pour *SUZ12* ou *EED* par rapport à des MPNST au PRC2 intact. L'ontologie de ces gènes était très similaire à celle des gènes surexprimés dans nos modèles. En tous, 89 gènes étaient surexprimés à la fois dans les tumeurs et dans nos modèles. La surexpression spécifique de certains de ces gènes dans les cellules PRC2 mutées a été validée en RT-qPCR dans les SPW1 tSUZ12_Cl6 et _Cl11 ainsi que dans les SUSA tSUZ12_Cl17 et _Cl18 pour quelques uns de ces gènes (Figure 2F). Un ChIP-seq H3K27me3 est en cours dans les SPW1 WT et Cl6 pour identifier les cibles directes du PRC2 dans ces cellules.

Conséquences phénotypiques de l'inactivation de composants essentiels du complexe PRC2.

Dans le but de mieux caractériser les conséquences cellulaires *in vitro* de la perte du PRC2 dans les cellules de Schwann, nous avons comparé la prolifération cellulaire, le cycle cellulaire, la migration cellulaire et l'apoptose des cellules SPW1 WT et SPW1 tSUZ12_Cl6 et _Cl11. De façon surprenante, les tests de prolifération *in vitro* (comptage ou WST1) ont montré une vitesse de croissance des SPW1 WT supérieure à celle des deux clones indépendants de SPW1 tSUZ12 (Figure 3A). Cependant, les cellules WT et mutées ne présentaient pas de différences significatives au niveau des expériences de cycle cellulaire (Figure 3B). De plus, la capacité de migration des SPW1 tSUZ12 était inférieure à celles des cellules sauvages (Figure 3C). Enfin, après induction de l'apoptose par la staurosporine, les clones mutés rentraient plus fréquemment en apoptose précoce et tardive que les cellules WT (Figure 3D). Ces tests cellulaires *in vitro* suggèrent que la contribution de PRC2 aux propriétés tumorales impliquent probablement des changements des propriétés cellulaires plus compliqués que la simple réponse transcriptomique conséquente à son inactivation.

Afin de mieux comprendre cette contradiction apparente sur le rôle de PRC2 et dans le but de découvrir des stratégies thérapeutiques prenant avantage de l'inactivation de PRC2, nous avons réalisé deux approches afin d'identifier des léthalités syntétiques spécifiques à l'inactivation de PRC2. Dans un permier temps, nous avons évalué la réponse à une petite librairie de composés chimiques interférant avec des régulateurs de la chromatine. Dans un second temps, nous avons utilisé une approche plus large et sans à priori basée sur les librairies d'ARNgs.

Crible chimique de molécules ciblant des modificateurs chromatiniens.

L'action de 36 inhibiteurs ciblant des modificateurs chromatiniens a été évaluée en terme de survie des cellules SPW1 tSUZ12_Cl6 et SPW1 WT. L'objectif de ce test était d'identifier des évènements de létalités synthétiques spécifiques de l'inactivation du PRC2. Dans un premier temps la dose minimale efficace et la dose maximale conseillée par le SGC ont été testées pour chaque inhibiteur sur sept jours. Seize inhibiteurs entrainaient une diminution d'au moins 20% de survie normalisée par rapport à un contrôle DMSO, sur l'un des types cellulaires et pour au moins une des doses testées (Figure 4A).

L'évaluation du ratio de survie des cellules SPW1 WT par rapport aux SPW1 tSUZ12_Cl6 a permis d'identifier trois inhibiteurs qui entrainaient une mortalité supérieure chez les SPW1 tSUZ12_Cl6 par rapport aux SPW1 WT à la fois pour la dose minimale et la dose maximale (Figure 4B). Pour ces trois inhibiteurs : GSK591, Olaparib et GSK-J4, les courbes Effet/Dose sur les SPW1 tSUZ12_Cl6 ont été comparées à celles sur les SPW1 WT (Figure 4C). Les drogues GSK591 et Olaparib, à la différence de GSK-J4, montraient bien une mortalité significativement plus importante sur les SPW1 tSUZ12_Cl6 par rapport aux SPW1 WT.

Un point critique de l'interprétation de ces expériences était la différence basale de vitesse de prolifération des cellules SPW1 WT et mutées (Figure 3A). Pour étudier l'effet de GSK591 et Olaparib sur des cellules aux taux de proliférations comparables, des clones de SPW1 WT ont été dérivés. Deux clones SPW1 WT_Cl5 et SPW1 WT_Cl11 ont été sélectionnés puisqu'ils présentaient un temps de doublement comparable aux cellules SPW1 tSUZ12_Cl6 (Figure 4D). Les effets de GSK591 et Olaparib ont donc été testés sur ces deux clones SPW1 WT_Cl2 et SPW1 WT_Cl5 et comparés à leurs effets sur SPW1 tSUZ12_Cl6 et SPW1 tSUZ12_Cl11. Un test préliminaire n'a pas permis de confirmer une action significativement plus importante de ces deux inhibiteurs sur les cellules inactivées SUZ12 (Figure 4D).

Recherche de gènes de létalité synthétique avec la perte de SUZ12 par crible pan-génomique.

Afin d'identifier les gènes essentiels à la survie des SPW1 tSUZ12 spécifiquement, un crible pangénomique lentiCRISPR a été réalisé en parallèle sur les SPW1 WT et les SPW1 tSUZ12_Cl6. Deux cribles successifs permettant chacun une couverture de 250X pour chacun des ARN guides ont été effectués. Afin de comparer les échantillons à des temps de doublement équivalent, les ADNg des SPW1 WT et tSUZ12_Cl6 ont été récoltés à des temps

différents. Au cours du premier crible, les ADN des cellules SPW1 WT ont été récoltés à J-3, J0 et J21 et les ADN des cellules SPW1 tSUZ12_Cl6 ont été récoltés à J-5, J0 et J33. Au cours du deuxième crible, les ADN des cellules SPW1 WT ont été récoltés à J0, J10 et J21 et les ADN des cellules SPW1 tSUZ12_Cl6 ont été récoltés à J0, J14 et J31. Les ADNg sont actuellement en cours de séquençage.

II-3.4. Discussion et perspectives

Afin d'étudier les conséquences de la perte de fonction du PRC2 dans la transition maligne du neurofibrome plexiforme en MPNST, nous avons généré plusieurs lignées de cellules de Schwann humaines génétiquement inactivées pour les gènes *SUZ12* ou *EED*.

Etonnamment, l'inactivation de *SUZ12* n'a pas pour conséquence l'acquisition de propriétés tumorigéniques *in vitro*. Aucun avantage des cellules SPW1 tSUZ12_Cl6 ou_Cl11 n'a été observé par rapport aux SPW1 WT en terme de prolifération, migration cellulaire ou apoptose. Il est important de noter, qu'en plus de l'inactivation du PRC2, la transformation maligne d'un neurofibrome plexiforme en MPNST s'accompagne de mutations inactivatrices de *CDKN2A* et mutations gain de fonction du gène *TP53* dans respectivement 81% et 42% des MPNST (Lee *et al.* 2014). Ces mutations affectent les voies de régulation du cycle cellulaire $p16^{INK4A}$-$p15^{INK4B}$-CDK4/6-RB et $p14^{ARF}$-MDM2-p53. Les cellules SPW1 WT ont été obtenues après infection par des virus introduisant les mutants $CD4^{R24C}$ et $P53^{DN}$. Elles portent donc déjà une perturbation importante de cette voie nécessaire pour leur immortalisation et leur maintient en culture. C'est une raison possible permettant d'expliquer l'absence d'acquisition d'un potentiel tumorigénique visible par nos tests cellulaires. D'autre part, les tests cellulaires ne permettent pas de prendre en compte l'influence de l'environnement dont l'importance semble pourtant cruciale dans la tumorigenèse NF1, comme nous l'avons discuté dans l'introduction de cette thèse. Il serait donc intéressant à présent d'évaluer le potentiel tumorigénique de nos modèles cellulaires dans des systèmes de co-cultures (neurones/cellules de Schwann ou Schwann/fibroblastes ou Schwann/mastocytes) ou *in vivo* par des expériences de xénogreffe en souris immunodéficiente.

L'étude du transcriptome des cellules SPW1 SUZ12 mutées et WT a révélé la similarité des conséquences transcriptionnelles de la perte de fonction du PRC2 dans nos cellules par rapport aux MPNST mutées, ce qui indique que ces modèles cellulaires sont pertinents pour l'étude moléculaire de l'impact de la perte de PRC2. Elle a, en outre, permis d'isoler des gènes systématiquement surexprimés qui pourraient représenter des candidats intéressants comme marqueurs de la perte de fonction du PRC2 dans les MPNST. Dans ce but, des expériences de marquage immunohistochimique sur des MPNST mutées, avec des anticorps ciblant quelques uns des marqueurs que nous avons identifiés, sont en cours d'étude.

Un crible chimique de molécules ciblant des modificateurs chromatiniens n'a pas permis d'identifier des évènements de létalité synthétique spécifiques liés à l'inactivation du PRC2 dans notre modèle. Les évènements de létalité synthétique semblent être très spécifiques du type cellulaire étudié. Par exemple, la réponse des cellules mutées *BAP1* (*BRCA1-associated protein 1*) à des inhibiteurs d'EZH2 varie selon le type de tumeurs. Ainsi, la sensibilisation spécifiques des cellules de mésothéliomes mutées *BAP1* (*BRCA1-associated protein 1*) à l'inhibition d'EZH2 d'écrite par LaFave *et al.* n'est pas retrouvée dans les cellules de mélanomes uvéaux également porteuses de mutations de *BAP1* (Schoumacher *et al.* 2016).

L'identification des gènes essentiels à la survie cellulaire des SPW1 tSUZ12 spécifiquement par crible pan-génomique lentiCRIPSR représente un espoir d'identification de cibles thérapeutiques efficaces. Le cas échéant, les cibles identifiées au cours de ce crible devront être validées sur nos différents modèles isogéniques ainsi que sur des lignées de MPNST, *in vitro* et *in vivo* en condition de xénogreffe et/ou sur des modèles murins de MPNST impliquant la perte de PRC2.

II-3.5. Légendes des figures

Figure 1. Génération de modèles de cellules de Schwann humaines isogéniques WT ou mutées pour le PRC2.

A. A gauche: Western Blot de SUZ12, EED, Lamine B1 et H3K27me2/3 obtenu à partir d'extraits nucléaires des cellules SPW1 WT et de clones de SPW1 tSUZ12, tEED. A droite: Western Blot de NF1, SUZ12, EED, Lamine B1 et H3K27me2/3 obtenu à partir d'extraits nucléaires des cellules SUSA WT et de clones de SUSA tEED, tSUZ12, tNF1, tNF1_tEED et tNF1_tSUZ12.

B. Graphes du cycle cellulaire obtenus par cytométrie en flux après marquage à l'iodure de propidium des cellules SPW1 WT, tSUZ12_Cl6 et _Cl11.

C. Tableau récapitulatif des délétions retrouvées par CGH-array dans les cellules SPW1 WT, tSUZ12_Cl6 et _Cl11. Pour chaque délétion sont indiqués dans le tableau : le chromosome surlequel a lieu la délétion, les coordonnées de la délétion (start/stop), le nombre de sondes délétées, la valeur du log du ratio des intensités de fluorescence, la pvalue et le nom des gènes délétés.

D. Visualisation de la délétion au locus NF1/SUZ12. La position sélectionnée à gauche (en bleu) est zoomée à droite. Chaque point représente une sonde. La déviation de ces points sur la gauche indique une délétion.

Figure 2. Les cellules SPW1 tSUZ12 permettaient une modélisation transcriptomique satisfaisante des tumeurs mutées PRC2.

A. Analyse en composante principale montrant les deux premières dimensions pour chaque duplicat des cellules SPW1 WT, tSUZ12_Cl6 et _Cl11.

B. *Clustering* hiérarchique pour chaque duplicat des cellules SPW1 WT, tSUZ12_Cl6 et _Cl11.

C. Graphe représentant le log2(moyenne des FPKM des gènes dans les SPW1 tSUZ12_Cl6 et _Cl11) en fonction du log2(moyenne des FPKM des gènes dans les SPW1 WT). Les points représentés en rouge sont les GDE avec un log2(*fold change*) > 1 et une p-value adj < 0.05. Les points représentés en verts sont les GDE avec un log2(*fold change*) < -1 et une p-value adj < 0.05.

D. Diagramme de Venn représentant le chevauchement des GDE entre Cl6/WT et Cl11/WT. 1363 GDE sont partagés par Cl6/WT et Cl11/WT.

E. Ontologie des 1363 GDE identifiés en D. FDR : *False discovery rate.*

F. Expressions normalisées des gènes EYA1, NXPH2, HOXD11, HOXA13, PAX2, HOXB13 et HOXA11 évaluées par RT-qPCR sur les échantillons SPW1 WT, tSUZ12_Cl6 et _Cl11 (graphes supérieurs) et SUSA tNF1, SUSA tNF1 tSUZ12_Cl17 et _Cl18 (graphes inférieurs).

Figure 3. Conséquences phénotypiques de l'inactivation de composants essentiels du complexe PRC2.

A. Test de prolifération par comptage (figure supérieure) ou mesure de la densité optique après test WST1 (figure inférieure) des cellules SPW1 WT, tSUZ12_Cl6 et _Cl11.

B. Test de cycle cellulaire par co-marquage 7AAD, BrDU avec et sans privation de sérum des cellules SPW1 WT, tSUZ12_Cl6.

C. Test de migration cellulaire des cellules SPW1 WT, tSUZ12_Cl6. Les photos, d'un exemple de répartition des cellules au cours de ce test, sont montrées pour un des trois réplicats.

D. Test d'apoptose des cellules SPW1 WT, tSUZ12_Cl6 avec et sans induction par 0,1 et 0,5 µM de staurosporine. Les graphes des co-marquages Annexine 5 et 7AAD par cytométrie en flux sont représentés sur l'image de gauche. La mesure de ces co-marquages est représentée sur le graphe de droite.

Figure 4. Un crible chimique de molécules ciblant des modificateurs chromatiniens n'a pas permis d'identifier des évènements de létalité synthétique spécifiques de l'inactivation du PRC2.

A. Graphique de survie cellulaire normalisée des cellules SPW1 WT et SPW1 tSUZ12_Cl6 en présence de la dose minimale (min) et maximale (max) recommandée de chacun des 36 inhibiteurs épigénétiques. Les 17 inhibiteurs avec une survie cellulaire normalisée diminuée d'au moins 20% sont marqués d'une étoile.

B. Ratio de survie WT/Cl6 aux doses minimales et maximales pour les 17 inhibiteurs avec une survie cellulaire normalisée diminuée d'au moins 20%. Les trois inhibiteurs ayant un ratio supérieur à 1 sont marqués d'une étoile.

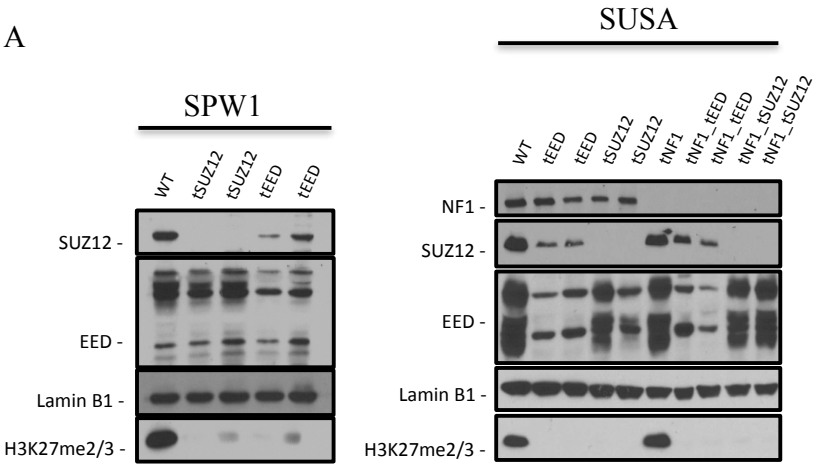
C. Graphes des courbes Effet/dose représentant le pourcentage de mortalité des SPW1 WT et SPW1 tSUZ12_Cl6 en fonction de sept doses de GSK591, Olaparib et GSK-J4.

D. A gauche: Test de prolifération par comptage des cellules SPW1 tSUZ12_Cl6 et des clones SPW1 WT_Cl2 et _Cl5. **A droite :** Graphes des courbes Effet/dose représentant le pourcentage de mortalité des SPW1 WT_Cl5 et _Cl11 ainsi que SPW1 tSUZ12_Cl6 et _Cl11 en fonction de sept doses de GSK591, Olaparib et GSK-J4.

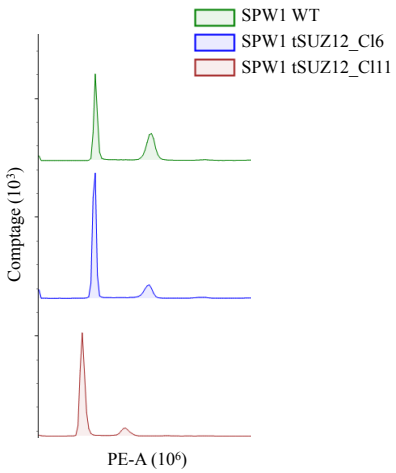
II-3.6. Figures

Figure 1

A



B



C

WT	Cl6	Cl11	Chr	Start	Stop	#Probes	Deletion	pval	Nom des gènes délétés
X	X	X	chr11	65 109 190	65 358 199	60	-0,579492	6,08E-74	DPF2, TIGD3, SLC25A45, FRMD8, NEAT1, MIR612, MALAT1, SCYL1, LTBP3, SSSCA1, FAM89B, EHBP1L1
X	X	X	chr17	29 024 352	30 342 666	233	-0,73567	NA	SUZ12P, CRLF3, ATAD5, C17orf42, ADAP2, RNF135, DPRXP4, NF1, OMG, EVI2B, EVI2A, RAB11FIP4, MIR193A, MIR365-2, C17orf79, UTP6, SUZ12
X	X	X	chr17	57 752 033	57 916 065	41	-0,910379	8,30E-65	CLTC, PTRH2, VMP1
X	X	X	chr21	22 568 838	22 692 338	30	-1,021333	3,80E-60	NCAM2
	X		chr2	141 670 454	142 114 091	86	-0,791343	5,09E-143	LRP1B
	X		chr13	33 743 462	33 801 378	15	-0,957638	5,29E-38	STARD13
		X	chr4	74 852 894	96 368 018	3294	-0,884816	NA	PPBP, CXCL5, CXCL3, PPBPL2, CXCL2, MTHFD2L, EPGN, EREG, AREG, BTC, PARM1, LOC441025, RCHY1, THAP6, C4orf26, CDKL2, G3BP2, USO1, PPEF2, NAAA, SDAD1, CXCL9, ART3, CXCL10, CXCL11, NUP54, SCARB2, FAM47E, STBD1, CCDC158, SHROOM3, ANKRD56, SEPT11, CCNI, CCNG2, CXCL13, CNOT6L, MRPL1, FRAS1, ANXA3, BMP2K, PAQR3, NAA11, GK2, GDEP, ANTXR2, PRDM8, FGF5, C4orf22, BMP3, PRKG2, RASGEF1B, HNRNPD, HNRPDL, ENOPH1, TMEM150C, C4orf11, SCD5, MIR575, SEC31A, LOC100499177, THAP9, LIN54, COPS4, PLAC8, COQ2, HPSE, HELQ, MRPS18C, FAM175A, AGPAT9, NKX6-1, CDS1, WDFY3, NCRNA00247, ARHGAP24, MAPK10, PTPN13, SLC10A6, C4orf36, AFF1, KLHL8, HSD17B13, HSD17B11, NUDT9, SPARCL1, DSPP, DMP1, IBSP, MEPE, HSP90AB3P, SPP1, PKD2, ABCG2, PPM1K, HERC6, HERC5, PIGY, HERC3, NAP1L5, FAM13AOS, FAM13A, TIGD2, GPRIN3, SNCA, MMRN1, FAM190A, TMSL3, GRID2, ATOH1, SMARCAD1, HPGDS, PDLIM5, BMPR1B, UNC5C

D

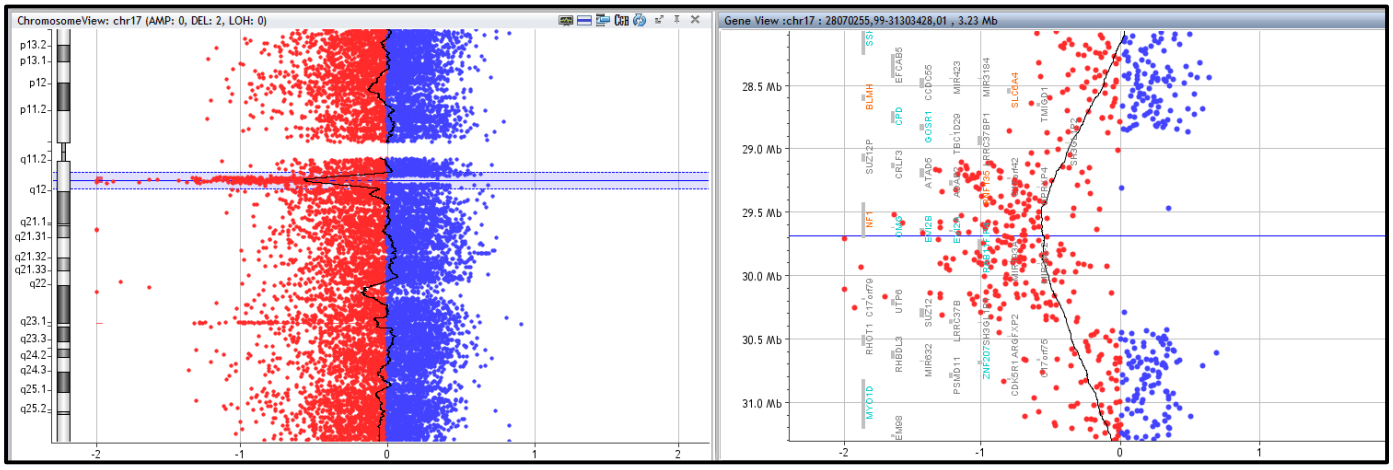


Figure 2

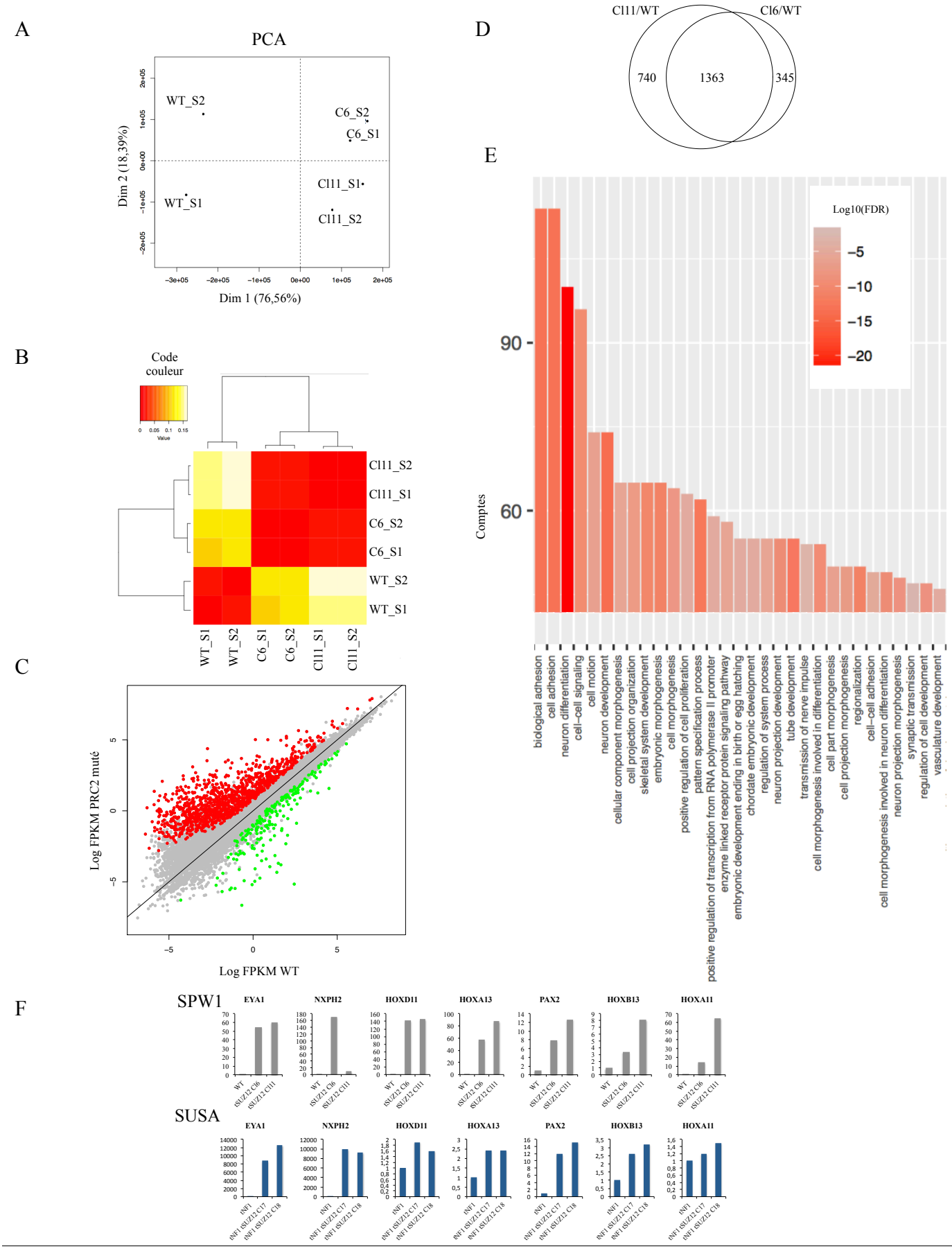
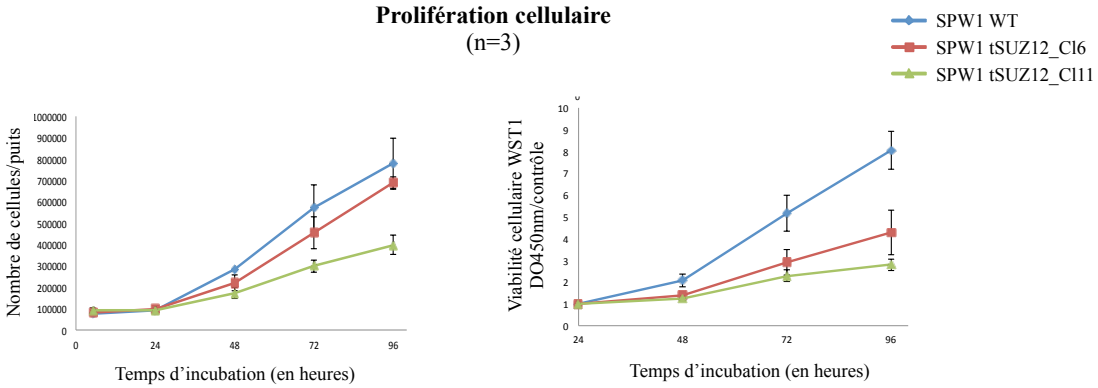
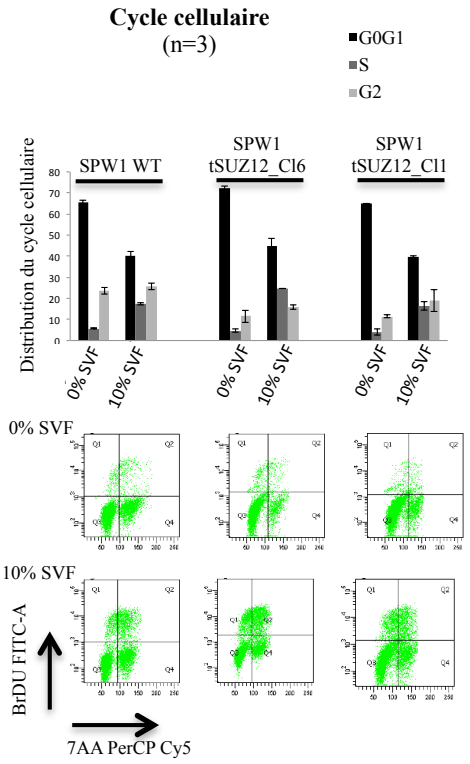

A
PCA
WT_S2
C6_S2
C6_S1
Cl11_S1
WT_S1
Cl11_S2
Dim 2 (18,39%)
Dim 1 (76,56%)
B
Code couleur
Cl11_S2
Cl11_S1
C6_S2
C6_S1
WT_S2
WT_S1
C
Log FPKM PRC2 muté
Log FPKM WT
D
Cl11/WT
Cl6/WT
740
1363
345
E
Log10(FDR)
Comptes
biological adhesion
cell adhesion
neuron differentiation
cell−cell signaling
cell motion
neuron development
cellular component morphogenesis
cell projection organization
skeletal system development
embryonic morphogenesis
cell morphogenesis
positive regulation of cell proliferation
pattern specification process
positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter
enzyme linked receptor protein signaling pathway
embryonic development ending in birth or egg hatching
chordate embryonic development
regulation of system process
neuron projection development
tube development
transmission of nerve impulse
cell morphogenesis involved in differentiation
cell part morphogenesis
cell projection morphogenesis
regionalization
cell−cell adhesion
cell morphogenesis involved in neuron differentiation
neuron projection morphogenesis
synaptic transmission
regulation of cell development
vasculature development
F
SPW1
SUSA
EYA1
NXPH2
HOXD11
HOXA13
PAX2
HOXB13
HOXA11

Figure 3

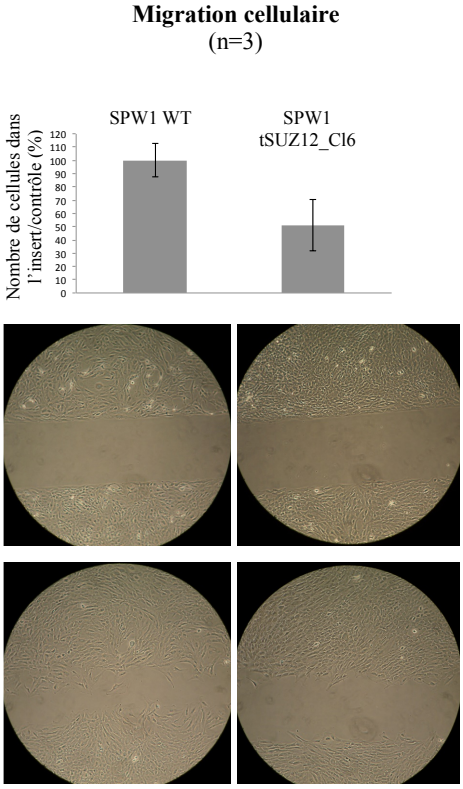
A



B



C



D

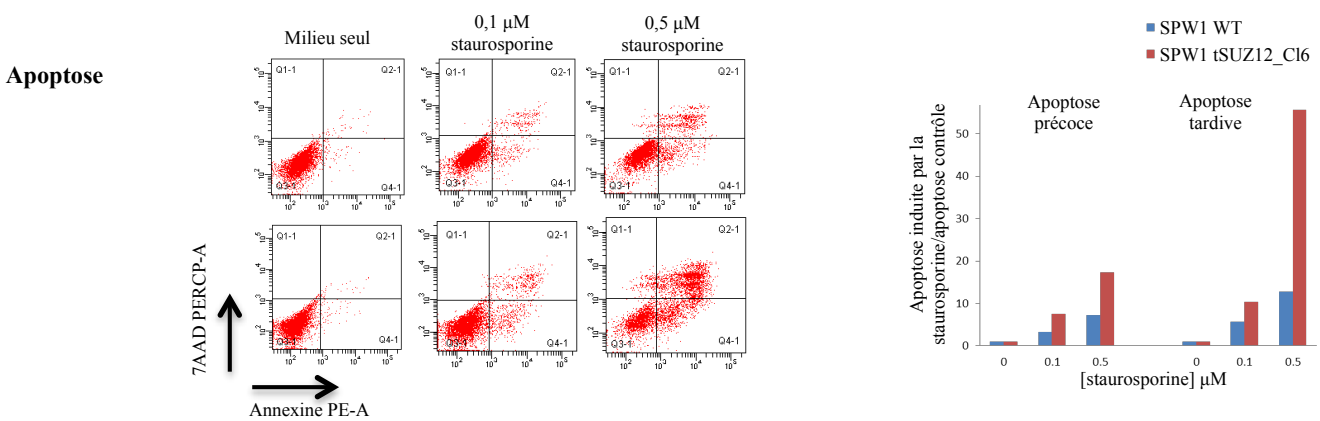
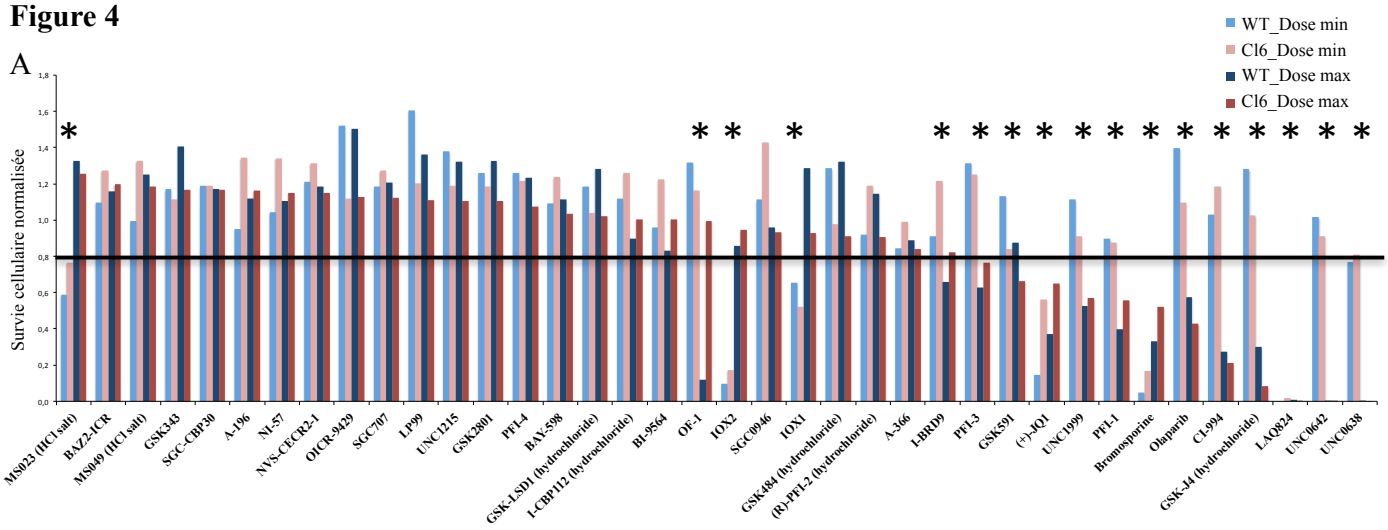
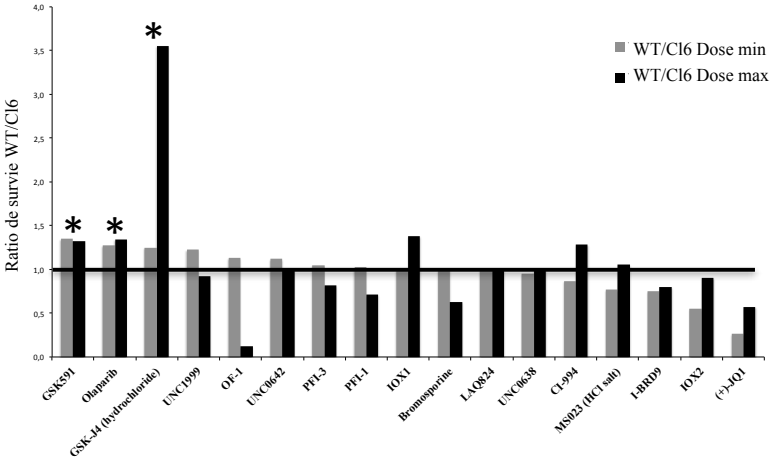


Figure 4

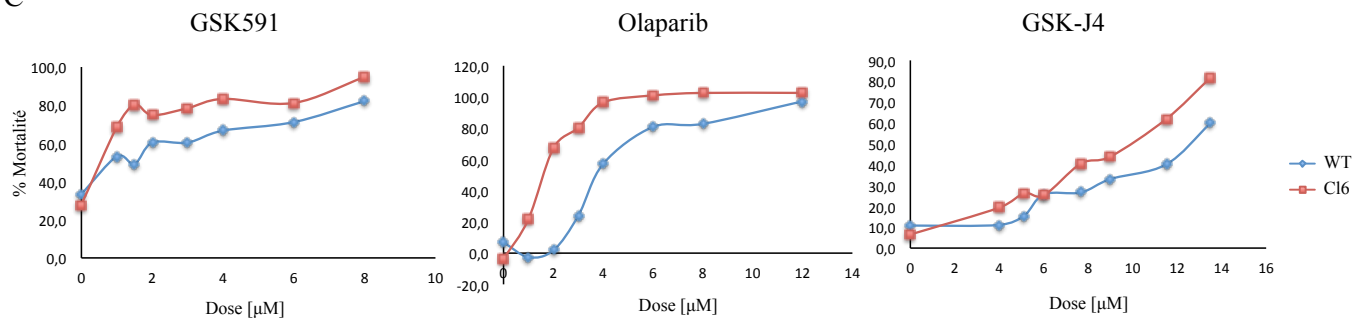
A



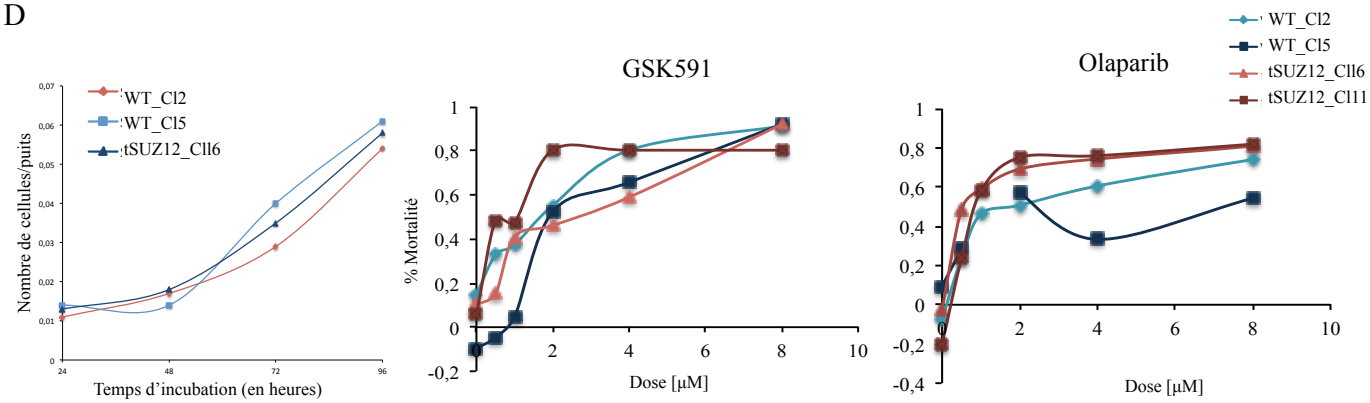
B



C



D



II-3.7. Bibliographie

Anders S, Huber W. Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol.* 2010;11:R106.

Anders S, Pyl PT, Huber W. HTSeq – A Python framework to work with high-throμghput sequencing data. *Bioinformatics.* 2015;31(2):166-9

Arrowsmith CH, Bountra C, Fish PV, Lee K, Schapira M. Epigenetic protein families: a new frontier for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov.* 2012;11(5):384-400. Review.

Bitler BG, Aird KM, Garipov A, Li H, Amatangelo M, Kossenkov AV, Schultz DC, Liu Q, Shih IeM, Conejo-Garcia JR, *et al*. Synthetic lethality by targeting EZH2 methyltransferase activity in ARID1A-mutated cancers. *Nat Med*. 2015;21(3):231-8.

De Raedt T, Beert E, Pasmant E, Luscan A, Brems H, Ortonne N, Helin K, Hornick JL, Mautner V, Kehrer-Sawatzki H, *et al*. PRC2 loss amplifies Ras-driven transcription and confers sensitivity to BRD4-based therapies. *Nature*. 2014;514(7521):247-51.

Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, Batut P, Chaisson M, Gingeras TR. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics.* 2013;29(1):15-21.

Hirbe AC, Gutmann DH. Neurofibromatosis type 1: a multidisciplinary approach to care. *Lancet Neurol.* 2014;13(8):834-43. Review.

Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc.* 2009;4:44–57.

Kim KH, Kim W, Howard TP, Vazquez F, Tsherniak A, Wu JN, Wang W, Haswell JR, Walensky LD, Hahn WC, Orkin SH, Roberts CW. SWI/SNF-mutant cancers depend on catalytic and non-catalytic activity of EZH2. *Nat Med*. 2015;21(12):1491-6. doi: 10.1038/nm.3968. Epub 2015 Nov 9.

LaFave LM, Béguelin W, Koche R, Teater M, Spitzer B, Chramiec A, Papalexi E, Keller MD, Hricik T, Konstantinoff K, *et al*. Loss of BAP1 function leads to EZH2-dependent transformation. *Nat Med*. 2015;21(11):1344-9.

Lee W, Teckie S, Wiesner T, Ran L, Prieto Granada CN, Lin M, Zhu S, Cao Z, Liang Y, Sboner A, *et al.* PRC2 is recurrently inactivated through EED or SUZ12 loss in malignant peripheral nerve sheath tumors. *Nat Genet*. 2014;46(11):1227-32.

Lu XJ, Qi X, Zheng DH, Ji LJ. Modeling cancer processes with CRISPR-Cas9. *Trends Biotechnol.* 2015;33(6):317-9.

Margueron R, Li G, Sarma K, Blais A, Zavadil J, Woodcock CL, Dynlacht BD, Reinberg D. Ezh1 and Ezh2 maintain repressive chromatin through different mechanisms. *Mol Cell.* 2008;32(4):503-18.

Margueron R, Reinberg D. The Polycomb complex PRC2 and its mark in life. *Nature.* 2011;469(7330):343-9. Review.

McCabe MT, Ott HM, Ganji G, Korenchuk S, Thompson C, Van Aller GS, Liu Y, Graves AP, Della Pietra A 3rd, Diaz E, *et al*. EZH2 inhibition as a therapeutic strategy for lymphoma with EZH2-activating mutations. *Nature*. 2012;492(7427):108-12.

Ratner N, Miller SJ. A RASopathy gene commonly mutated in cancer: the neurofibromatosis type 1 tumour suppressor. *Nat Rev Cancer.* 2015;15(5):290-301. Review.

Schoumacher M, Le Corre S, Houy A, Mulugeta E, Stern MH, Roman-Roman S, Margueron R. Uveal melanoma cells are resistant to EZH2 inhibition regardless of BAP1 status. *Nat Med.* 2016;22(6):577-8.

Shalem O, Sanjana NE, Hartenian E, Shi X, Scott DA, Mikkelsen TS, Heckl D, Ebert BL, Root DE, Doench JG, Zhang F. Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells. *Science.* 2014;343(6166):84-7.

Toledo CM, Ding Y, Hoellerbauer P, Davis RJ, Basom R, Girard EJ, Lee E, Corrin P, Hart T, Bolouri H *et al*. Genome-wide CRISPR-Cas9 Screens Reveal Loss of Redundancy between PKMYT1 and WEE1 in Glioblastoma Stem-like Cells. *Cell Rep.* 2015;13(11):2425-39.

Wang T, Birsoy K, Hµghes NW, Krupczak KM, Post Y, Wei JJ, Lander ES, Sabatini DM. Identification and characterization of essential genes in the human genome. *Science.* 2015;350(6264):1096-101.

Wang T, Wei JJ, Sabatini DM, Lander ES. Genetic screens in human cells using the CRISPR-Cas9 system. *Science.* 2014;343(6166):80-4.

Wassef M, Rodilla V, Teissandier A, Zeitouni B, Gruel N, Sadacca B, Irondelle M, Charruel M, Ducos B, Michaud A, *et al*. Impaired PRC2 activity promotes transcriptional instability and favors breast tumorigenesis. *Genes Dev.* 2015;29(24):2547-62.

Zhang M, Wang Y, Jones S, Sausen M, McMahon K, Sharma R, Wang Q, Belzberg AJ, Chaichana K, Gallia GL, *et al*. Somatic mutations of SUZ12 in malignant peripheral nerve sheath tumors. *Nat Genet*. 2014;46(11):1170-2.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Ces études ont permis de progresser dans la connaissance des bases moléculaires de la tumorigenèse de la neurofibromatose de type 1. Elle ont permis d'identifier, spécifiquement dans les tumeurs malignes de la gaine des nerfs, une dérégulation de la voie de signalisation WNT ainsi qu'une perte de fonction du répresseur transcriptionnel PRC2 associée à une surexpression d'un ensemble de gènes. Ces anomalies ont été confirmées par des données récentes de la littérature et ouvrent des perspectives nouvelles pour la prise en charge des patients.

Comme nous l'avons vu, le diagnostic anatomo-pathologique des MPNST reste parfois difficile du fait notamment de l'absence de marqueurs spécifiques. La recherche de la perte du marquage H3K27me3 pourrait passer en pratique courante dans les laboratoires d'anatomo-pathologies. Depuis la publication de nos données, plusieurs équipes d'anatomo-pathologies ont d'ailleurs rapporté l'intérêt de l'immunohistochimie H3K27me3 dans le diagnostic différentiel des MPNST (Schaefer *et al.* 2016 ; Prieto-Granada *et al.* 2016 ; Röhrich *et al.* 2016 ; Cleven *et al.* 2016). Ces équipes retrouvent bien une perte de la marque H3K27me3 dans respectivement 51%, 69%, 78% et 34% des MPNST et spécifiquement à ce stade de malignité. Les neurofibromes cutanés, plexifomes, atypiques et épithélioïdes conservent, en effet, un marquage H3K27me3 positif.
Une équipe rapporte également une corrélation négative entre la perte d'H3K27me3 dans les MPNST et la survie globale (Cleven *et al.* 2016). Elle propose donc la perte du marquage H3K27me3 comme marqueur de mauvais pronostic.
En outre, des études parfois contradictoires de la marque H3K27me3 par immunohistochimie au sein d'autres types de sarcomes ont mis en évidence la perte du marquage H3K27me3 dans 60% des synovialosarcomes ainsi que dans 38% des fibrosarcomes et dermatofibrosarcomes protubérants (Cleven *et al.* 2016). Il serait donc intéressant d'associer l'analyse de la marque H3K27me3 ainsi que la recherche d'anomalies du PRC2 dans ces types particuliers de sarcomes afin d'améliorer la compréhension des évènements moléculaires de ces tumeurs et de confronter ces résultats à ceux des MPNST.
Il est également probable que la poursuite de l'analyse des RNA-seq de nos modèles PRC2 mutés nous permette d'identifier de nouveaux marqueurs caractéristiques des MPNST mutés PRC2. Ces marqueurs pourront être d'une grande aide au diagnostic.

Bien que le marquage H3K27me3 soit positif dans les neurofibromes plexiformes et les neurofibromes atypiques, il serait intéressant d'effectuer un séquençage ciblé profond de ces

tumeurs intermédiaires, à la recherche des mutations de *SUZ12* ou *EED* retrouvées dans leur MPNST appariées. Cette recherche pourrait permettre d'identifier un événement génétique très précoce et donc de comprendre le *timing* précis d'apparition de l'événement mutationnel au cours du développement tumoral.

Une interrogation majeure reste en suspens à propos des MPNST conservant un PRC2 et un marquage H3K27me3 intacts. Ce groupe de MPNST représenterait environ 30% de la totalité des tumeurs, ce qui reste un groupe relativement conséquent. Quels évènements moléculaires sont à l'origine du développement de ce groupe de tumeurs ? Les efforts doivent à présent se concentrer sur cette question cruciale. L'analyse d'exomes d'un nombre significatif de ces tumeurs pourra peut-être apporter une réponse. Une autre piste pourrait être identifiée grâce à l'étude plus poussée des voies de signalisation majeures dérégulées en aval de la mutation du PRC2. L'analyse transcriptomique comparative de tumeurs mutées et non mutées dans le PRC2 pourrait ensuite permettre de confirmer ou d'infirmer l'existence de voies de signalisation alternatives dans le développement des MPNST selon la perte ou la conservation d'H3K27me3. Enfin, une activation des complexes Trx, aux fonctions antagonistes à PcG sur la balance des états d'expression des gènes, pourrait être une autre hypothèse à explorer pour expliquer la tumorigenèse des MPNST sans inactivation de PRC2.

Le profil mutationnel restreint à *SUZ12* et *EED* dans les MPNST avec, en particulier, l'absence de mutations d'*EZH2* est intéressant à confronter aux profils mutationnels des autres tumeurs présentant une altération de la triméthylation d'H3K27. Par exemple, comme nous l'avions souligné précédemment, à ce jour, la mutation K27M semble être spécifique des GHG alors qu'aucune altération d'*EZH2*, *SUZ12* ou *EED* n'y est retrouvée. D'autre part *EZH2* est le gène majoritairement muté dans les pathologies hématopoïétiques. Donc, même au sein des tumeurs ayant comme conséquence commune la perte de la triméthylation d'H3K27 et une dé-répression des gènes cibles du PRC2, la nature des gènes altérés peut être complétement différente. La comparaison des conséquences fonctionnelles de chaque type de ces mutations semble donc absolument nécessaire afin de comprendre, à l'avenir, leurs rôles respectifs.

L'identification de mutations de *SUZ12* et *EED* dans les MPNST vient compléter la liste de plus en plus importante des altérations génétiques de modificateurs de la chromatine impliqués dans les processus tumoraux. En 2013, Timp et Feinberg avaient listé l'ensemble

de ces altérations et leur fréquence dans les tumeurs dans lesquelles elles survenaient (Timp et Feinberg 2013). Cette analyse révélait que la plupart des mutations de modificateurs de la chromatine dans les tumeurs solides étaient impliquées dans des types de tumeurs rares et agressives chez l'adulte ou dans des cancers pédiatriques. Ils soulignaient également l'importance de la fréquence de ces mutations dans les tumeurs réfractaires ou résistantes au traitement. Par exemple, la forme commune d'adénocarcinome pancréatique présentait 8% de mutation de l'histone acétyltransférase *EP300* alors que plus de 44% des cancers rares neuroendocrines pancréatiques portaient une mutation de l'histone méthyltransférase *MEN1*. De même, 35% des glioblastomes pédiatriques présentaient des mutations d'*H3F3A* alors que les glioblastomes adultes, beaucoup plus fréquent, ne présentaient que 3,4% de mutations d'*H3F3A*. En outre, des mutations du remodeleur de la chromatine *ARID1A* ont été décrites dans 57% et 46% des adénocarcinomes ovariens à cellules claires, qui est un sous-type rare et particulièrement agressif des cancers de l'ovaires alors qu'aucune mutation d'*ARID1A* n'est retrouvée dans les carcinomes de haut-grade qui est le type le plus courant de carcinomes de l'ovaire. Les raisons de ce profil particulier des tumeurs solides présentant des mutations de modificateurs de la chromatine ne sont, à ce jour, pas comprises.

D'autres processus de tumorigenèse montrent une séquence mutationnelle en deux temps impliquant un modificateur de la chromatine, comme nous le décrivons dans la tumorigenèse des MPNST. Ainsi, un mécanisme à quatre évènements mutationnels impliquant *NF2* et *SMARCB1* a été rapporté dans les schwannomes de la neurofibromatose de type 2 (Sestini *et al.* 2009). Dans un autre exemple, la tumorigenèse des mélanomes uvéaux s'effectue également schématiquement en deux étapes. Les mutations mutuellement exclusives de *GNAQ* ou *GNA11* sont les évènements mutationnels précoces qui peuvent être suivis de mutations, de mauvais pronostic, dans le gène suppresseur de tumeur *BAP1* (Wang *et al.* 2016). Or, que ce soit pour *SMARCB1* ou *BAP1*, des mutations germinales de ces gènes ont récemment été décrites comme responsable de prédisposition tumorale. Ainsi, la mutation germinale de *SMARCB1* est à l'origine d'un syndrome de prédisposition aux schwannomes et ménigiomes (Hulsebos *et al.* 2007). De même la mutation germinale de *BAP1* est à l'origine d'un syndrome de prédisposition aux mésotheliomes, aux mélanomes cutanés, aux mélanomes uvéaux et à d'autres cancers (Rai *et al.* 2016). Il est donc important de suivre régulièrement les patients Weaver présentant des mutations constitutionnelles de membres du PRC2, qui pourraient être prédisposés au développement de tumeurs.

Des modèles murins inactivés en cis *Nf1* ; *Suz12* ou *Nf1* ; *Suz12 ; p53* ont été établis par l'équipe de K Cichowski de l'Université d'Harvard à Boston. Ces souris développaient des tumeurs de type MPNST, ce qui confirme l'hypothèse du rôle suppresseur de tumeur de SUZ12 dans la tumorigenèse NF1. Mais ces souris développaient également des mélanomes dans 9% des cas et des gliomes de haut grade dans 54% des cas. Or, l'analyse génomique des mélanomes et des GBM humains sur le TCGA montrait quelques cas de co-délétion/mutation de *NF1* et *SUZ12* ou *EED*. Des tests *in vitro* ont été effectués avec des cellules de GBM et de mélanomes. Dans ces modèles cellulaires, l'ablation de *SUZ12* favorisait la formation de colonies dans des cellules mutées *NF1* alors qu'elle n'avait pas d'effet dans des cellules *NF1* sauvages. L'ensemble de ces données suggérent la co-occurrence d'altérations de *NF1* et du PRC2 et la coopération de ces altérations dans les tumeurs étudiés.

D'autres études ont rapporté une coopération entre l'activation de la voie RAS et la perte de fonction du PRC2 dans le processus tumoral. Ainsi, la perte de fonction d'*EZH2* accélèrerait la progression des tumeurs pancréatiques mutées $KRAS^{G12D}$ (Mallen-St. Clair *et al.* 2012). De plus, Serresi *et al.* ont décrit que le PRC2 était un régulateur critique dans la progression des cancers du poumon non à petites cellules mutés *KRAS*. Dans ce type de tumeurs, une perte de fonction du PRC2 accélère la formation d'adénocarcinomes aggressifs *drivée* par *KRAS* (Serresi *et al.* 2016). D'autre part, Kim *et al.* ont rapporté que les lignées cellulaires cancéreuses mutées SWI/SNF porteuses d'une mutation activatrice de *RAS* étaient moins dépendantes d'EZH2 que les lignées cellulaires *RAS* sauvage. Ces données suggéraient donc que la léthalité synthétique entre SWI/SNF et EZH2 n'était pas observée dans les cellules cancéreuses porteuses d'une mutation activatrice de RAS (Kim *et al.* 2015).

La relation entre la perte de fonction de PRC2 et l'activation d'autres voies oncogéniques que la voie RAS a, par ailleurs, aussi été rapportée. Par exemple, Ntziachristos *et al.* décrivent la coopération de la perte de fonction de PRC2 et de l'activation de NOTCH1 dans la transformation cellulaire conduisant à la survenue de leucémie aigüe lymphoblastique T. Ce groupe montre dans leurs travaux que la perte de fonction de PRC2 potentialise le programme transcriptionnel induit par NOTCH1 et augmente ainsi le potentiel tumorigène dans les LAL-T (Ntziachristos *et al.* 2011).

Enfin, il a été rapporté que des voies de signalisation pouvaient moduler directement la structure chromatinienne. Par exemple, Dawson *et al.* montrent que, dans les noyaux des cellules hématopoiétiques, JAK2 peut phosphoryler Y41 sur l'histone H3, empêchant ainsi la liaison d'HP1α (*Heterochromatin Protein 1 alpha*) à cette histone. L'activation constitutive de JAK2 dans les cancers hématopoïétiques empêcherait donc la liaison d'HP1α à l'histone H3 et modifierait ainsi la structure chromatinienne (Dawson *et al.* 2009).

La connaissance des mécanismes de régulation de l'expression des gènes par les différents modificateurs chromatiniens est relativement limitée à ce jour. Une hypothèse corroborée par différentes études fondamentales serait que les modifications de la conformation de la chromatine sont comme une barrière de régulation fine de la transcription des gènes. Selon cette hypothèse, les modificateurs chromatiniens, au lieu d'être des *drivers* de changements d'expression génique, seraient alors plutôt des gardiens de l'intégrité transcriptionnelle. La perte de fonction du PRC2 aurait ainsi pour conséquence d'abolir une barrière de régulation des gènes, ce qui permettrait à la cellule d'activer des gènes qui seraient sinon rester à l'état silencieux. Cette hypothèse permettrait d'expliquer pourquoi, selon le contexte cellulaire, la perte de fonction du PRC2 faciliterait le potentiel tumorigène induit par diverses voies de signalisation oncogéniques comme la voie RAS ou la voie NOTCH…

Ces travaux avaient pour objectif final l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques afin de proposer de nouveaux traitements aux patients NF1 développant des MPNST. Des espoirs de réponses sont permis avec l'analyse des résultats de séquençage des ADN du screen lentiCRISPR. Les cibles identifiées devront être interprétées à la lumière des données de CGH-*array*, validées *in vitro* puis *in vivo*. La nécessité de disposer de modèles appropriés *in vivo* s'impose alors d'où la perspective de la réalisation de xénogreffes par injection de nos modèles cellulaires mutants dans des souris *nude* ou par la manipulation de souris transgéniques.

Enfin, l'ensemble de mes travaux révèle l'importance d'une étroite collaboration entre les laboratoires de recherche fondamentale, les laboratoires de biologie moléculaire et d'anatomo-pathologie, les services de médecine clinique et de chirurgie. L'établissement de relations rapprochées entre ces différentes entités est essentiel à l'avancée des connaissances au service des patients.

BIBLIOGRAPHIE

A. Chenn, C.A. Walsh Regulation of cerebral cortical size by control of cell cycle exit in neural precursors *Science* 2002;297:365–369

Abdel-Wahab O, Adli M, LaFave LM, Gao J, Hricik T, Shih AH, Pandey S, Patel JP, Chung YR, Koche R, *et al.* ASXL1 mutations promote myeloid transformation through loss of PRC2-mediated gene repression. *Cancer Cell.* 2012;22:180-93.

Amores A, Force A, Yan YL, Joly L, Amemiya C, Fritz A, Ho RK, Langeland J, Prince V, Wang YL, Westerfield M, Ekker M, Postlethwait JH. Zebrafish hox clusters and vertebrate genome evolution. *Science.* 1998;282(5394):1711-4.

Amsterdam A, Sadler KC, Lai K, Farrington S, Bronson RT, Lees JA, Hopkins N. Many ribosomal protein genes are cancer genes in zebrafish. *PLoS Biol*. 2004;2(5):E139.

Anastasaki C, Gutmann DH. Neuronal NF1/RAS regulation of cyclic AMP requires atypical PKC activation. *Hum Mol Genet.* 2014;23(25):6712-21.

Andersen LB, Ballester R, Marchuk DA, Chang E, Gutmann DH, Saulino AM, Camonis J, Wigler M, Collins FS. A conserved alternative splice in the von Recklinghausen neurofibromatosis (NF1) gene produces two neurofibromin isoforms, both of which have GTPase-activating protein activity. *Mol Cell Biol.* 1993;13:487-95.

Angers S, Moon RT. Proximal events in Wnt signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009;10(7):468-77. Review.

Antonescu CR, Sung YS, Chen CL, Zhang L, Chen HW, Singer S, Agaram NP, Sboner A, Fletcher CD. Novel ZC3H7B-BCOR, MEAF6-PHF1, and EPC1-PHF1 fusions in ossifying fibromyxoid tumors--molecular characterization shows genetic overlap with endometrial stromal sarcoma. Genes Chromosomes Cancer. 2014;53(2):183-93.

Aoki Y, Niihori T, Inoue S, Matsubara Y. Recent advances in RASopathies. *J Hum Genet.* 2016;61:33-9.

Ariës IM, Gutierrez A. An X-linked tumor suppressor in T-ALL. *Blood.* 2015;125(1):3-4.

Arnold P, Schöler A, Pachkov M, Balwierz PJ, Jørgensen H, Stadler MB, van Nimwegen E, Schübeler D. Modeling of epigenome dynamics identifies transcription factors that mediate Polycomb targeting. *Genome Res.* 2013;23(1):60-73.

Arun V, Wiley JC, Kaur H, Kaplan DR, Guha A A novel neurofibromin (NF1) interaction with the leucine-rich pentatricopeptide repeat motif-containing protein links neurofibromatosis type 1 and the French Canadian variant of Leigh's syndrome in a common molecular complex. *Journal of neuroscience research* 2013;91:494-505.

Asthagiri AR, Parry DM, Butman JA, Kim HJ, Tsilou ET, Zhuang Z, Lonser RR. Neurofibromatosis type 2. *Lancet.* 2009;373(9679):1974-86. Review.

Ballaré C, Lange M, Lapinaite A, Martin GM, Morey L, Pascual G, Liefke R, Simon B, Shi Y, Gozani O, Carlomagno T, Benitah SA, Di Croce L. Phf19 links methylated Lys36 of histone H3 to regulation of Polycomb activity. *Nat Struct Mol Biol.* 2012;19(12):1257-65.

Ballester R, Marchuk D, Boguski M, Saulino A, Letcher R, Wigler M, Collins F The NF1 locus encodes a protein functionally related to mammalian GAP and yeast IRA proteins. *Cell* 1990;63:851-859.

Banaszynski LA, Wen D, Dewell S, Whitcomb SJ, Lin M, Diaz N, Elsässer SJ, Chapgier A, Goldberg AD, Canaani E, Rafii S, Zheng D, Allis CD. Hira-dependent histone H3.3 deposition facilitates PRC2 recruitment at developmental loci in ES cells. *Cell*. 2013;155(1):107-20.

Barski A, Cuddapah S, Cui K, Roh TY, Schones DE, Wang Z, Wei G, Chepelev I, Zhao K. High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell.* 2007;129(4):823-37.

Bartke T, Vermeulen M, Xhemalce B, Robson SC, Mann M, Kouzarides T. Nucleosome-interacting proteins regulated by DNA and histone methylation. *Cell.* 2010;143:470-84.

Beert E, Brems H, Daniëls B, De Wever I, Van Calenbergh F, Schoenaers J, Debiec-Rychter M, Gevaert O, De Raedt T, Van Den Bruel A, *et al*. Atypical neurofibromas in neurofibromatosis type 1 are premalignant tumors. *Genes Chromosomes Cancer.* 2011;50:1021-32.

Béguelin W, Popovic R, Teater M, Jiang Y, Bunting KL, Rosen M, Shen H, Yang SN, Wang L, Ezponda T, et al. EZH2 is required for germinal center formation and somatic EZH2 mutations promote lymphoid transformation. *Cancer Cell.* 2013;23(5):677-92.

Bejar R, Stevenson K, Abdel-Wahab O, Galili N, Nilsson B, Garcia-Manero G, Kantarjian H, Raza A, Levine RL, Neuberg D, *et al*. Clinical effect of point mutations in myelodysplastic syndromes. *N Engl J Med*. 2011;364(26):2496-506.

Bender S, Tang Y, Lindroth AM, Hovestadt V, Jones DT, Kool M, Zapatka M, Northcott PA, Sturm D, Wang W, *et al*. Reduced H3K27me3 and DNA hypomethylation are major drivers of gene expression in K27M mutant pediatric high-grade gliomas. *Cancer Cell.* 2013;24(5):660-72.

Berg T, Thoene S, Yap D, Wee T, Schoeler N, Rosten P, Lim E, Bilenky M, Mungall AJ, Oellerich T, *et al*. A transgenic mouse model demonstrating the oncogenic role of mutations in the polycomb-group gene EZH2 in lymphomagenesis. *Blood*. 2014;123(25):3914-24.

Berghmans S, Murphey RD, Wienholds E, Neuberg D, Kutok JL, Fletcher CD, Morris JP, Liu TX, Schulte-Merker S, Kanki JP, *et al*. tp53 mutant zebrafish develop malignant peripheral nerve sheath tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(2):407-12.

Bitler BG, Aird KM, Garipov A, Li H, Amatangelo M, Kossenkov AV, Schultz DC, Liu Q, Shih IeM, Conejo-Garcia JR, *et al.* Synthetic lethality by targeting EZH2 methyltransferase activity in ARID1A-mutated cancers. *Nat Med.* 2015;21(3):231-8.

Bodemann BO, White MA. Ral GTPases and cancer: linchpin support of the tumorigenic platform. *Nat Rev Cancer.* 2008;8(2):133-40. Review.

Bödör C, Grossmann V, Popov N, Okosun J, O'Riain C, Tan K, Marzec J, Araf S, Wang J, Lee AM, et al. EZH2 mutations are frequent and represent an early event in follicular lymphoma. *Blood.* 2013;122(18):3165-8.

Bollag G, McCormick F, Clark R Characterization of full-length neurofibromin: tubulin inhibits Ras GAP activity. *The EMBO journal* 11993;2:1923-1927.

Boyanapalli M, Lahoud OB, Messiaen L, Kim B, Anderle de Sylor MS, Duckett SJ, Somara S, Mikol DD Neurofibromin binds to caveolin-1 and regulates ras, FAK, and Akt. *Biochemical and biophysical research communications* 2006;340:1200-1208.

Bracken AP, Kleine-Kohlbrecher D, Dietrich N, Pasini D, Gargiulo G, Beekman C, Theilgaard-Mönch K, Minucci S, Porse BT, Marine JC, *et al*. The Polycomb group proteins bind throughout the INK4A-ARF locus and are disassociated in senescent cells. *Genes Dev*. 2007;21(5):525-30.

Bracken AP, Pasini D, Capra M, Prosperini E, Colli E, Helin K. EZH2 is downstream of the pRB–E2F pathway, essential for proliferation and amplified in cancer. *EMBO J*. 2003;22(20):5323-35.

Bradley WD, Arora S, Busby J, Balasubramanian S, Gehling VS, Nasveschuk CG, Vaswani RG, Yuan CC, Hatton C, Zhao F*, et al.* EZH2 inhibitor efficacy in non-Hodgkin's lymphoma does not require suppression of H3K27 monomethylation. *Chem Biol*. 2014;21(11):1463-75.

Brannan CI, Perkins AS, Vogel KS, Ratner N, Nordlund ML, Reid SW, Buchberg AM, Jenkins NA, Parada LF, Copeland NG. Targeted disruption of the neurofibromatosis type-1 gene leads to developmental abnormalities in heart and various neural crest-derived tissues. *Genes Dev.* 1994;8(9):1019-29.

Brekke HR, Ribeiro FR, Kolberg M, Agesen TH, Lind GE, Eknaes M, Hall KS, Bjerkehagen B, van den Berg E, Teixeira MR, *et al.* Genomic changes in chromosomes 10, 16, and X in malignant peripheral nerve sheath tumors identify a high-risk patient group. *J Clin Oncol.* 2010;28:1573-1582.

Brems H, Beert E, de Ravel T, Legius E. Mechanisms in the pathogenesis of malignant tumours in neurofibromatosis type 1. *Lancet Oncol.* 2009;10:508-15.

Brems H, Chmara M, Sahbatou M, Denayer E, Taniguchi K, Kato R, Somers R, Messiaen L, De Schepper S, Fryns JP, *et al.* Germline loss-of-function mutations in SPRED1 cause a neurofibromatosis 1-like phenotype. *Nat Genet.* 2007;39(9):1120-6.

Brown JA, Diggs-Andrews KA, Gianino SM, Gutmann DH. Neurofibromatosis-1 heterozygosity impairs CNS neuronal morphology in a cAMP/PKA/ROCK-dependent manner. *Mol Cell Neurosci.* 2012;49(1):13-22.

Brown JA, Gianino SM, Gutmann DH. Defective cAMP generation underlies the sensitivity of CNS neurons to neurofibromatosis-1 heterozygosity. *J Neurosci.* 2010;30(16):5579-89.

Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature.* 2008;455(7216):1061-8.

Cao R, Zhang Y. SUZ12 is required for both the histone methyltransferase activity and the silencing function of the EED-EZH2 complex. *Mol Cell.* 2004;15(1):57-67.

Carli M, Ferrari A, Mattke A, Zanetti I, Casanova M, Bisogno G, Cecchetto G, Alaggio R, De Sio L, Koscielniak E, *et al.* Pediatric malignant peripheral nerve sheath tumor: the Italian and German soft tissue sarcoma cooperative group. *J Clin Oncol.* 2005;23:8422-30.

Carroll SL. Molecular mechanisms promoting the pathogenesis of Schwann cell neoplasms. *Acta Neuropathol.* 2012;123(3):321-48. Review.

Castel D, Philippe C, Calmon R, Le Dret L, Truffaux N, Boddaert N, Pagès M, Taylor KR, Saulnier P, Lacroix L, *et al.* Histone H3F3A and HIST1H3B K27M mutations define two subgroups of diffuse intrinsic pontine gliomas with different prognosis and phenotypes. *Acta Neuropathol.* 2015;130(6):815-27.

Castellsagué J, Gel B, Fernández-Rodríguez J, Llatjós R, Blanco I, Benavente Y, Pérez-Sidelnikova D, García-Del Muro J, Viñals JM, Vidal A, *et al.* Comprehensive establishment and characterization of orthoxenograft mouse models of malignant peripheral nerve sheath tumors for personalized medicine. *EMBO Mol Med.* 2015;7(5):608-27.

Caye A, Strullu M, Guidez F, Cassinat B, Gazal S, Fenneteau O, Lainey E, Nouri K, Nakhaei-Rad S, Dvorsky R, *et al.* Juvenile myelomonocytic leukemia displays mutations in components of the RAS pathway and the PRC2 network. *Nat Genet.* 2015;47(11):1334-40.

Cerami E, Gao J, Dogrusoz U, Gross BE, Sumer SO, Aksoy BA, Jacobsen A, Byrne CJ, Heuer ML, Larsson E, *et al.* The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discov.* 2012;2(5):401-4.

Chan KM, Fang D, Gan H, Hashizume R, Yu C, Schroeder M, Gupta N, Mueller S, James CD, Jenkins R, *et al*. The histone H3.3K27M mutation in pediatric glioma reprograms H3K27 methylation and gene expression. *Genes Dev*. 2013;27(9):985-90.

Chase A, Cross NC. Aberrations of EZH2 in cancer. *Clin Cancer Res*. 2011;17(9):2613-8. Review.

Chen H, Gu X, Su IH, Bottino R, Contreras JL, Tarakhovsky A, Kim SK. Polycomb protein Ezh2 regulates pancreatic beta-cell Ink4a/Arf expression and regeneration in diabetes mellitus. *Genes Dev.* 2009 ;23(8):975-85.

Chen S, Bohrer LR, Rai AN, Pan Y, Gan L, Zhou X, Bagchi A, Simon JA, Huang H. Cyclin-dependent kinases regulate epigenetic gene silencing through phosphorylation of EZH2. *Nat Cell Biol.* 2010;12(11):1108-14.

Chen S, Ma J, Wu F, Xiong LJ, Ma H, Xu W, Lv R, Li X, Villen J, Gygi SP, Liu XS, Shi Y. The histone H3 Lys 27 demethylase JMJD3 regulates gene expression by impacting transcriptional elongation. *Genes Dev.* 2012;26(12):1364-75.

Chu C, Zhang QC, da Rocha ST, Flynn RA, Bharadwaj M, Calabrese JM, Magnuson T, Heard E, Chang HY. Systematic discovery of Xist RNA binding proteins. *Cell.* 2015;161(2):404-16.

Cichowski K, Shih TS, Schmitt E, Santiago S, Reilly K, McLaughlin ME, Bronson RT, Jacks T. Mouse models of tumor development in neurofibromatosis type 1. *Science.* 1999 Dec;286(5447):2172-6.

Ciferri C, Lander GC, Maiolica A, Herzog F, Aebersold R, Nogales E. Molecular architecture of human polycomb repressive complex 2. *Elife.* 2012;1:e00005.

Cleven AH, Sannaa GA, Briaire-de Bruijn I, Ingram DR, van de Rijn M, Rubin BP, de Vries MW, Watson KL, Torres KE, Wang WL, *et al.* Loss of H3K27 tri-methylation is a diagnostic marker for malignant peripheral nerve sheath tumors and an indicator for an inferior survival. *Mod Pathol.* 2016;29(6):582-90.

Cleven AH, Sannaa GA, Briaire-de Bruijn I, Ingram DR, van de Rijn M, Rubin BP, de Vries MW, Watson KL, Torres KE, Wang WL, *et al*. Loss of H3K27 tri-methylation is a diagnostic marker for malignant peripheral nerve sheath tumors and an indicator for an inferior survival. *Mod Pathol.* 2016;29(6):582-90.

Cohen AS, Gibson WT. EED-associated overgrowth in a second male patient. *J Hum Genet*. 2016 May 19.*Epub*

Cohen AS, Tuysuz B, Shen Y, Bhalla SK, Jones SJ, Gibson WT. A novel mutation in EED associated with overgrowth. *J Hum Genet.* 2015;60(6):339-42.

Cohen AS, Yap DB, Lewis ME, Chijiwa C, Ramos-Arroyo MA, Tkachenko N, Milano V, Fradin M, McKinnon ML, Townsend KN, *et al.* Weaver Syndrome-Associated EZH2 Protein Variants Show Impaired Histone Methyltransferase Function In Vitro. *Hum Mutat.* 2016;37(3):301-7.

Coindre JM. Grading of soft tissue sarcomas: review and update. *Arch Pathol Lab Med.* 2006;130(10):1448-53. Review

Colicelli J. Human RAS superfamily proteins and related GTPases. *Sci STKE.* 2004;2004(250):RE13. Review.

Colombo S, Paiardi C, Pardons K, Winderickx J, Martegani E. Evidence for adenylate cyclase as a scaffold protein for Ras2-Ira interaction in Saccharomyces cerevisie. *Cell Signal.* 2014;26(5):1147-54.

Conklin CM, Longacre TA. Endometrial stromal tumors: the new WHO classification. *Adv Anat Pathol.* 2014;21(6):383-93. Review.

Creyghton MP, Markoulaki S, Levine SS, Hanna J, Lodato MA, Sha K, Young RA, Jaenisch R, Boyer LA. H2AZ is enriched at polycomb complex target genes in ES cells and is necessary for lineage commitment. *Cell.* 2008;135(4):649-61.

Cutter AR, Hayes JJ. A brief review of nucleosome structure. *FEBS Lett*. 2015;589(20 Pt A):2914-22. Review.

D'Angelo I, Welti S, Bonneau F, Scheffzek K. A novel bipartite phospholipid-binding module in the neurofibromatosis type 1 protein. *EMBO Rep.* 2006;7(2):174-9.

Dasgupta B, Dugan LL, Gutmann DH. The neurofibromatosis 1 gene product neurofibromin regulates pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-mediated signaling in astrocytes. *J Neurosci.* 2003;23(26):8949-54.

Dawson MA, Bannister AJ, Gottgens B, Foster SD, Bartke T, Green AR, Kouzarides T. JAK2 phosphorylates histone H3Y41 and excludes HP1a from chromatine. *Nature.* 2009;461 :819-822.

De Craene B, Berx G. Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression. *Nat Rev Cancer.* 2013;13:97-110.

De Raedt T, Maertens O, Chmara M, Brems H, Heyns I, Sciot R, Majounie E, Upadhyaya M, De Schepper S, Speleman F*, et al*. Somatic loss of wild type NF1 allele in neurofibromas: Comparison of NF1 microdeletion and non-microdeletion patients. *Genes Chromosomes Cancer.* 2006;45(10):893-904.

De Santa F, Totaro MG, Prosperini E, Notarbartolo S, Testa G, Natoli G. The histone H3 lysine-27 demethylase Jmjd3 links inflammation to inhibition of polycomb-mediated gene silencing. *Cell.* 2007;130(6):1083-94.

De Schepper S, Boucneau J, Lambert J, Messiaen L, Naeyaert JM. Pigment cell-related manifestations in neurofibromatosis type 1: an overview. *Pigment Cell Res.* 2005;18:13-24.

De Schepper S, Boucneau JM, Westbroek W, Mommaas M, Onderwater J, Messiaen L, Naeyaert JM, Lambert JL Neurofibromatosis type 1 protein and amyloid precursor protein interact in normal human melanocytes and colocalize with melanosomes*. The Journal of investigative dermatology* 2006;126:653-659.

Di Croce L, Helin K. Transcriptional regulation by Polycomb group proteins. *Nat Struct Mol Biol.* 2013;20(10):1147-55.

Dorschner MO, Sybert VP, Weaver M, Pletcher BA, Stephens K. NF1 microdeletion breakpoints are clustered at flanking repetitive sequences. *Hum Mol Genet.* 2000;9(1):35-46.

Douglas J, Cilliers D, Coleman K, Tatton-Brown K, Barker K, Bernhard B, Burn J, Huson S, Josifova D, Lacombe D, et al. Mutations in RNF135, a gene within the NF1 microdeletion region, cause phenotypic abnormalities including overgrowth. *Nat Genet.* 2007;39(8):963-5.

Dunzendorfer-Matt T, Mercado EL, Maly K, McCormick F, Scheffzek K. The neurofibromin recruitment factor Spred1 binds to the GAP related domain without affecting Ras inactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016 *Epub*

Endo M, Kobayashi C, Setsu N, Takahashi Y, Kohashi K, Yamamoto H, Tamiya S, Matsuda S, Iwamoto Y, Tsuneyoshi M, Oda Y. Prognostic significance of p14ARF, p15INK4b, and p16INK4a inactivation in malignant peripheral nerve sheath tumors. *Clin Cancer Res.* 2011;17(11):3771-82.

Endo M, Kohashi K, Yamamoto H, Ishii T, Yoshida T, Matsunobu T, Iwamoto Y, Oda Y. Ossifying fibromyxoid tumor presenting EP400-PHF1 fusion gene. Hum Pathol. 2013;44(11):2603-8.

Ernst T, Chase AJ, Score J, Hidalgo-Curtis CE, Bryant C, Jones AV, Waghorn K, Zoi K, Ross FM, Reiter A, et al. Inactivating mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myeloid disorders. Nat. Genet. 2010;42(8):722-6.

Eskeland R, et al. Ring1B compacts chromatin structure and represses gene expression independent of histone ubiquitination. Molecular cell. 2010;38:452–464.

Faust C, Lawson KA, Schork NJ, Thiel B, and Magnuson T. The Polycomb-group gene eed is required for normal morphogenetic movements during gastrulation in the mouse embryo. *Development.* 1998;125(22):4495-506.

Faust C, Schumacher A, Holdener B, and Magnuson T. The eed mutation disrupts anterior mesoderm production in mice. *Development.* 1995;121(2):273-85.

Fawcett JW, Keynes RJ. Peripheral nerve regeneration. *Annu Rev Neurosci.* 1990;13:43-60.

Feitsma H, Kuiper RV, Korving J, Nijman IJ, Cuppen E. Zebrafish with mutations in mismatch repair genes develop neurofibromas and other tumors. *Cancer Res*. 2008;68(13):5059-66.

Feng L, Yunoue S, Tokuo H, Ozawa T, Zhang D, Patrakitkomjorn S, Ichimura T, Saya H, Araki N. PKA phosphorylation and 14-3-3 interaction regulate the function of neurofibromatosis type I tumor suppressor, neurofibromin. *FEBS Lett.* 2004;557(1-3):275-82.

Feng L, Yunoue S, Tokuo H, Ozawa T, Zhang D, Patrakitkomjorn S, Ichimura T, Saya H, Araki N PKA phosphorylation and 14-3-3 interaction regulate the function of neurofibromatosis type I tumor suppressor, neurofibromin. *FEBS letters* 2004;557:275-282.

Ferner RE. Neurofibromatosis 1 and neurofibromatosis 2: a twenty first century perspective. *Lancet Neurol.* 2007;6:340-51.

Flex E, Jaiswal M, Pantaleoni F, Martinelli S, Strullu M, Fansa EK, Caye A, De Luca A, Lepri F, Dvorsky R, *et al.* Activating mutations in RRAS underlie a phenotype within the RASopathy spectrum and contribute to leukaemogenesis. *Hum Mol Genet.* 2014;23(16):4315-27.

Forbes SH, Dorschner MO, Le R, Stephens K. Genomic context of paralogous recombination hotspots mediating recurrent NF1 region microdeletion. *Genes Chromosomes Cancer.* 2004;41(1):12-25.

Forment JV, Kaidi A, Jackson SP. Chromothripsis and cancer: causes and consequences of chromosome shattering. *Nat Rev Cancer.* 2012;12(10):663-70. Review.

Funato K, Major T, Lewis PW, Allis CD, Tabar V. Use of human embryonic stem cells to model pediatric gliomas with H3.3K27M histone mutation. *Science*. 2014;346(6216):1529-33.

Gao J, Aksoy BA, Dogrusoz U, Dresdner G, Gross B, Sumer SO, Sun Y, Jacobsen A, Sinha R, Larsson E, *et al.* Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Sci Signal.* 2013;6(269):pl1.

Garapaty-Rao S, Nasveschuk C, Gagnon A, Chan EY, Sandy P, Busby J, Balasubramanian S, Campbell R, Zhao F, Bergeron L, *et al*. Identification of EZH2 and EZH1 small molecule inhibitors with selective impact on diffuse large B cell lymphoma cell growth. *Chem Biol*. 2013;20(11):1329-39.

Gebre-Medhin S, Nord KH, Möller E, Mandahl N, Magnusson L, Nilsson J, Jo VY, Vult von Steyern F, Brosjö O, Larsson O, *et al*. Recurrent rearrangement of the PHF1 gene in ossifying fibromyxoid tumors. Am J Pathol. 2012;181(3):1069-77

Gehrke I, Gandhirajan RK, Kreuzer KA. Targeting the WNT/beta-catenin/TCF/LEF1 axis in solid and haematological cancers: Multiplicity of therapeutic options. *Eur J Cancer.* 2009;45(16):2759-67.

Gibson WT, Hood RL, Zhan SH, Bulman DE, Fejes AP, Moore R, Mungall AJ, Eydoux P, Babul-Hirji R, An J, Marra MA, *et al.* Mutations in EZH2 cause Weaver syndrome. *Am J Hum Genet.* 2012;90(1):110-8.

Gil J, Peters G. Regulation of the INK4b-ARF-INK4a tumour suppressor locus: all for one or one for all. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006;7(9):667-77. Review.

Gitler AD, Zhu Y, Ismat FA, Lu MM, Yamauchi Y, Parada LF, Epstein JA. Nf1 has an essential role in endothelial cells. *Nat Genet.* 2003;33(1):75-9.

Gold MG, Fowler DM, Means CK, Pawson CT, Stephany JJ, Langeberg LK, Fields S, Scott JD. Engineering A-kinase anchoring protein (AKAP)-selective regulatory subunits of protein kinase A (PKA) through structure-based phage selection. *J Biol Chem.* 2013;288(24):17111-21.

Greenfield A, Carrel L, Pennisi D, Philippe C, Quaderi N, Siggers P, Steiner K, Tam PP, Monaco AP, Willard HF, *et al.*The UTX gene escapes X inactivation in mice and humans. *Hum Mol Genet.* 1998 Apr;7(4):737-42.

Gregorian C, Nakashima J, Dry SM, Nghiemphu PL, Smith KB, Ao Y, Dang J, Lawson G, Mellinghoff IK, Mischel PS, Phelps M, Parada LF, Liu X, Sofroniew MV, Eilber FC, Wu H. PTEN dosage is essential for neurofibroma development and malignant transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106:19479-19484.

Gresset A, Coulpier F, Gerschenfeld G, Jourdon A, Matesic G, Richard L, Vallat JM, Charnay P, Topilko P. Boundary Caps Give Rise to Neurogenic Stem Cells and Terminal Glia in the Skin. *Stem Cell Reports*. 2015;5(2):278-90.

Grijzenhout A, Godwin J, Koseki H, Gdula M, Szumska D, McGouran JF, Bhattacharya S, Kessler BM, Brockdorff N, Cooper S. Functional analysis of AEBP2, a PRC2 Polycomb protein, reveals a Trithorax phenotype in embryonic development and in ES cells. *Development.* 2016 , *Epub.*

Gui Y, Guo G, Huang Y, Hu X, Tang A, Gao S, Wu R, Chen C, Li X, Zhou L, *et al.* Frequent mutations of chromatin remodeling genes in transitional cell carcinoma of the bladder. *Nat Genet.* 2011;43(9):875-8.

Guo HF, Tong J, Hannan F, Luo L, Zhong Y. A neurofibromatosis-1-regulated pathway is required for learning in Drosophila. *Nature.* 2000;403(6772):895-8.

Gupta RA, Shah N, Wang KC, Kim J, Horlings HM, Wong DJ, Tsai MC, Hung T, Argani P, Rinn JL, *et al.* Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis. *Nature*. 2010;464(7291):1071-6.

Hadfield KD, Newman WG, Bowers NL, Wallace A, Bolger C, Colley A, McCann E, Trump D, Prescott T, Evans DG. Molecular characterisation of SMARCB1 and NF2 in familial and sporadic schwannomatosis. *J Med Genet*. 2008;45(6):332-9.

Hakimi MA, Speicher DW, Shiekhattar R The motor protein kinesin-1 links neurofibromin and merlin in a common cellular pathway of neurofibromatosis. *The Journal of biological chemistry* 2002;277:36909-36912.

Han Z, Xing X, Hu M, Zhang Y, Liu P, Chai J. Structural basis of EZH2 recognition by EED. *Structure.* 2007;15(10):1306-15.

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011;144(5):646-74. Review.

Hashizume R, Andor N, Ihara Y, Lerner R, Gan H, Chen X, Fang D, Huang X, Tom MW, Ngo V, *et al*. Pharmacologic inhibition of histone demethylation as a therapy for pediatric brainstem glioma. *Nat Med*. 2014;20(12):1394-6.

Hegedus B, Dasgupta B, Shin JE, Emnett RJ, Hart-Mahon EK, Elghazi L, Bernal-Mizrachi E, Gutmann DH. Neurofibromatosis-1 regulates neuronal and glial cell differentiation from neuroglial progenitors in vivo by both cAMP- and Ras-dependent mechanisms. *Cell Stem Cell.* 2007;1(4):443-57.

Herz HM, Morgan M, Gao X, Jackson J, Rickels R, Swanson SK, Florens L, Washburn MP, Eissenberg JC, Shilatifard A. Histone H3 lysine-to-methionine mutants as a paradigm to study chromatin signaling. *Science.* 2014;345(6200):1065-70.

Hirabayashi Y, Suzki N, Tsuboi M, Endo TA, Toyoda T, Shinga J, Koseki H, Vidal M, Gotoh Y. Polycomb limits the neurogenic competence of neural precursor cells to promote astrogenic fate transition. *Neuron.* 2009;63(5):600-13.

Hirata Y, Brems H, Suzuki M, Kanamori M, Okada M, Morita R, Llano-Rivas I, Ose T, Messiaen L, Legius E, *et al.* Interaction between a Domain of the Negative Regulator of the Ras-ERK Pathway, SPRED1 Protein, and the GTPase-activating Protein-related Domain of Neurofibromin Is Implicated in Legius Syndrome and Neurofibromatosis Type 1. *J Biol Chem.* 2016;291(7):3124-34.

Hirbe AC, Gutmann DH. Neurofibromatosis type 1: a multidisciplinary approach to care. *Lancet Neurol.* 2014;13:834-43. Review

Hirota S, Nomura S, Asada H, Ito A, Morii E, Kitamura Y. Possible involvement of c-kit receptor and its ligand in increase of mast cells in neurofibroma tissues. *Arch Pathol Lab Med.* 1993;117(10):996-9.

Hodgson, J. W., Argiropoulos, B. and Brock, H. W. Site-specific recognition of a 70-base-pair element containing d(GA)(n) repeats mediates bithoraxoid Polycomb group response element-dependent silencing. *Mol. Cell. Biol*. 2001;21:4528-4543

Hodis E, Watson IR, Kryukov GV, Arold ST, Imielinski M, Theurillat JP, Nickerson E, Auclair D, Li L, Place C, *et al.* A landscape of driver mutations in melanoma. *Cell.* 2012;150(2):251-63.

Hollstein PE, Cichowski K Identifying the Ubiquitin Ligase complex that regulates the NF1 tumor suppressor and Ras. *Cancer discovery* 2013;3:880-893.

Hrzenjak A. JAZF1/SUZ12 gene fusion in endometrial stromal sarcomas. *Orphanet J Rare Dis.* 2016;11:15.

Hsueh YP, Roberts AM, Volta M, Sheng M, Roberts RG. Bipartite interaction between neurofibromatosis type I protein (neurofibromin) and syndecan transmembrane heparan sulfate proteoglycans. *J Neurosci.* 2001;21(11):3764-70.

Hu T, Li C. Convergence between Wnt-β-catenin and EGFR signaling in cancer. *Mol Cancer.* 2010;9:236. Review.

Hulsebos, T.J. *et al.* Germline mutation of INI1/SMARCB1 in familial schwannomatosis. *Am. J. Hum. Genet.* 2007;80:805–810.

Hunkapiller J, Shen Y, Diaz A, Cagney G, McCleary D, Ramalho-Santos M, Krogan N, Ren B, Song JS, Reiter JF. Polycomb-like 3 promotes polycomb repressive complex 2 binding to CpG islands and embryonic stem cell self-renewal. *PLoS Genet.* 2012;8(3):e1002576.

Huson SM, Compston DA, Clark P, Harper PS. A genetic study of von Recklinghausen neurofibromatosis in south east Wales. I. Prevalence, fitness, mutation rate, and effect of parental transmission on severity. *J Med Genet*. 1998;26:704-11.

Jacks T, Shih TS, Schmitt EM, Bronson RT, Bernards A, Weinberg RA. Tumour predisposition in mice heterozygous for a targeted mutation in Nf1. *Nat Genet.* 1994;7(3):353-61.

Jacob Y, Feng S, LeBlanc CA, Bernatavichute YV, Stroud H, Cokus S, Johnson LM, Pellegrini M, Jacobsen SE, Michaels SD. ATXR5 and ATXR6 are H3K27 monomethyltransferases required for chromatin structure and gene silencing. *Nat Struct Mol Biol*. 2009;16(7):763-8.

Jankowska AM, Makishima H, Tiu RV, Szpurka H, Huang Y, Traina F, Visconte V, Sugimoto Y, Prince C, O'Keefe C, *et al.* Mutational spectrum analysis of chronic myelomonocytic leukemia includes genes associated with epigenetic regulation: UTX, EZH2, and DNMT3A. *Blood.* 2011;118(14):3932-41.

Jermann P, Hoerner L, Burger L, Schübeler D. Short sequences can efficiently recruit histone H3 lysine 27 trimethylation in the absence of enhancer activity and DNA methylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(33):E3415-21.

Jessen KR, Mirsky R. The origin and development of glial cells in peripheral nerves. *Nat Rev Neurosci*.2005;6:671-82.

Jessen WJ, Miller SJ, Jousma E, Wu J, Rizvi TA, Brundage ME, Eaves D, Widemann B, Kim MO, Dombi E, *et al.* MEK inhibition exhibits efficacy in human and mouse neurofibromatosis tumors. J Clin Invest. 2013;123(1):340-7.

Jones C, Baker SJ. Unique genetic and epigenetic mechanisms driving paediatric diffuse high-grade glioma. *Nat Rev Cancer.* 2014;14(10). Review.

Jones S, Stransky N, McCord CL, Cerami E, Lagowski J, Kelly D, Angiuoli SV, Sausen M, Kann L, Shukla M, *et al*. Genomic analyses of gynaecologic carcinosarcomas reveal frequent mutations in chromatin remodelling genes. *Nat Commun.* 2014;5:5006.

Joseph NM, Mosher JT, Buchstaller J, Snider P, McKeever PE, Lim M, Conway SJ, Parada LF, Zhu Y, Morrison SJ. The loss of Nf1 transiently promotes self-renewal but not tumorigenesis by neural crest stem cells. Cancer Cell. 2008;13(2):129-40.

Joseph NM, Mosher JT, Buchstaller J, Snider P, McKeever PE, Lim M, Conway SJ, Parada LF, Zhu Y, Morrison SJ. The loss of Nf1 transiently promotes self-renewal but not tumorigenesis by neural crest stem cells. *Cancer Cell*. 2008;13(2):129-40.

Justin N, Zhang Y, Tarricone C, Martin SR, Chen S, Underwood E, De Marco V, Haire LF, Walker PA, Reinberg D, *et al.* Structural basis of oncogenic histone H3K27M inhibition of human polycomb repressive complex 2. *Nat Commun.* 2016;7:11316.

Kahn M. Can we safely target the WNT pathway? *Nat Rev Drug Discov.* 2014;13(7):513-32. Review.

Kaminsky EB, Kaul V, Paschall J, Church DM, Bunke B, Kunig D, Moreno-De-Luca D, Moreno-De-Luca A, Mulle JG, Warren ST, *et al*. An evidence-based approach to establish the functional and clinical significance of copy number variants in intellectual and developmental disabilities. *Genet Med.* 2011;13(9):777-84.

Kan Z, Jaiswal BS, Stinson J, Janakiraman V, Bhatt D, Stern HM, Yue P, Haverty PM, Bourgon R, Zheng J, *et al*. Diverse somatic mutation patterns and pathway alterations in human cancers. *Nature.* 2010;466(7308):869-73.

Kaneko S, Li G, Son J, Xu CF, Margueron R, Neubert TA, Reinberg D. Phosphorylation of the PRC2 component Ezh2 is cell cycle-regulated and up-regulates its binding to ncRNA. *Genes Dev*. 2010;24(23):2615-20.

Karnoub AE, Weinberg RA. Ras oncogenes: split personalities. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008;9(7):517-31. Review.

Keng VW, Rahrmann EP, Watson AL, Tschida BR, Moertel CL, Jessen WJ, Rizvi TA, Collins MH, Ratner N, Largaespada DA. PTEN and NF1 inactivation in Schwann cells produces a severe phenotype in the peripheral nervous system that promotes the development and malignant progression of peripheral nerve sheath tumors. *Cancer Res.* 2012;72(13):3405-13.

Kim E, Ilagan JO, Liang Y, Daubner GM, Lee SC, Ramakrishnan A, Li Y, Chung YR, Micol JB, Murphy ME, *et al.* SRSF2 Mutations Contribute to Myelodysplasia by Mutant-Specific Effects on Exon Recognition. *Cancer Cell.* 2015;27:617-30.

Kim H, Kang K, Ekram MB, Roh TY, Kim J. Aebp2 as an epigenetic regulator for neural crest cells. *PLoS One.* 2011;6(9):e25174.

Kim H, Kang K, Kim J. AEBP2 as a potential targeting protein for Polycomb Repression Complex PRC2. *Nucleic Acids Res*. 2009;37(9):2940-50.

King D, Yang G, Thompson MA, Hiebert SW. Loss of neurofibromatosis-1 and p19(ARF) cooperate to induce a multiple tumor phenotype. *Oncogene.* 2002;21(32):4978-82.

Kingston RE, Tamkun JW. Transcriptional regulation by trithorax-group proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2014;6(10):a019349.

Klaus A, Birchmeier W. Wnt signalling and its impact on development and cancer. *Nat Rev Cancer.* 2008;8(5):387-98.

Klymenko T, Papp B, Fischle W, Köcher T, Schelder M, Fritsch C, Wild B, Wilm M, Müller J. A Polycomb group protein complex with sequence-specific DNA-binding and selective methyl-lysine-binding activities. *Genes Dev*. 2006;20(9):1110-22.

Knutson SK, Wigle TJ, Warholic NM, Sneeringer CJ, Allain CJ, Klaus CR, Sacks JD, Raimondi A, Majer CR, Song J, *et al.* A selective inhibitor of EZH2 blocks H3K27 methylation and kills mutant lymphoma cells. *Nat Chem Biol.* 2012;8(11):890-6.

Kohlmaier A, Savarese F, Lachner M, Martens J, Jenuwein T, Wutz A. A chromosomal memory triggered by Xist regulates histone methylation in X inactivation. *PLoS Biol*. 2004;2(7):E171.

Koontz, J.I., Soreng, A.L., Nucci, M., Kuo FC, Pauwels P, van Den Berghe H, Dal Cin P, Fletcher JA, Sklar J. Frequent fusion of the JAZF1 and JJAZ1 genes in endometrial stromal tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2001;98:6348-6353.

Kotake Y, Nakagawa T, Kitagawa K, Suzuki S, Liu N, Kitagawa M, Xiong Y. Long non-coding RNA ANRIL is required for the PRC2 recruitment to and silencing of p15(INK4B) tumor suppressor gene. *Oncogene.* 2011;30(16):1956-62.

Kourea HP, Orlow I, Scheithauer BW, Cordon-Cardo C, Woodruff JM. Deletions of the INK4A gene occur in malignant peripheral nerve sheath tumors but not in neurofibromas. *Am J Pathol.* 1999;155(6):1855-60.

Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell.* 2007;128(4):693-705. Review.

Krauthammer M, Kong Y, Ha BH, Evans P, Bacchiocchi A, McCusker JP, Cheng E, Davis MJ, Goh G, *et al.* Exome sequencing identifies recurrent somatic RAC1 mutations in melanoma. *Nat Genet.* 2012;44(9):1006-14.

Kresse SH, Skårn M, Ohnstad HO, Namløs HM, Bjerkehagen B, Myklebost O, Meza-Zepeda LA. DNA copy number changes in high-grade malignant peripheral nerve sheath tumors by array CGH. *Mol Cancer* 2008;7:48.

Ku M, Koche RP, Rheinbay E, Mendenhall EM, Endoh M, Mikkelsen TS, Presser A, Nusbaum C, Xie X, Chi AS, et al. Genomewide analysis of PRC1 and PRC2 occupancy identifies two classes of bivalent domains. *PLoS Genet.* 2008;4(10):e1000242.

Kurotaki N, Imaizumi K, Harada N, Masuno M, Kondoh T, Nagai T, Ohashi H, Naritomi K, Tsukahara M, Makita Y, *et al.* Haploinsufficiency of NSD1 causes Sotos syndrome. *Nat Genet.* 2002;30(4):365-6.

Kweh F, Zheng M, Kurenova E, Wallace M, Golubovskaya V, Cance WG Neurofibromin physically interacts with the N-terminal domain of focal adhesion kinase. *Molecular carcinogenesis* 2009;48:1005-1017.

Kweh F, Zheng M, Kurenova E, Wallace M, Golubovskaya V, Cance WG. Neurofibromin physically interacts with the N-terminal domain of focal adhesion kinase. *Mol Carcinog.* 2009;48(11):1005-17.

LaFave LM, Béguelin W, Koche R, Teater M, Spitzer B, Chramiec A, Papalexi E, Keller MD, Hricik T, Konstantinoff K, *et al.* Loss of BAP1 function leads to EZH2-dependent transformation. *Nat Med.* 2015;21(11):1344-9.

Lai K., Amsterdam A., Farrington S., Bronson R. T., Hopkins N., & Lees J. a. Many ribosomal protein mutations are associated with growth impairment and tumor predisposition in zebrafish. *Developmental Dynamics.* 2009;238(1):76–85.

Lan F, Bayliss PE, Rinn JL, Whetstine JR, Wang JK, Chen S, Iwase S, Alpatov R, Issaeva I, Canaani E, Roberts TM, Chang HY, Shi Y. A histone H3 lysine 27 demethylase regulates animal posterior development. *Nature.* 2007;449(7163):689-94.

Laugesen A, Helin K. Chromatin repressive complexes in stem cells, development, and cancer. *Cell Stem Cell.* 2014;14(6):735-51.

Le LQ, Liu C, Shipman T, Chen Z, Suter U, Parada LF. Susceptible stages in Schwann cells for NF1-associated plexiform neurofibroma development. *Cancer Res.* 2011;71(13):4686-95.

Le LQ, Parada LF. Tumor microenvironment and neurofibromatosis type I: connecting the GAPs. *Oncogene.* 2007;26(32):4609-16. Review.

Lee ST, Li Z, Wu Z, Aau M, Guan P, Karuturi RK, Liou YC, Yu Q. Context-specific regulation of NF-κB target gene expression by EZH2 in breast cancers. *Mol Cell.* 2011;43(5):798-810.

Lee W, Teckie S, Wiesner T, Ran L, Prieto Granada CN, Lin M, Zhu S, Cao Z, Liang Y, Sboner A, *et al.* PRC2 is recurrently inactivated through EED or SUZ12 loss in malignant peripheral nerve sheath tumors. *Nat Genet*. 2014;46(11):1227-32.

Lee Y, Song AJ, Baker R, Micales B, Conway SJ, and Lyons GE. Jumonji, a nuclear protein that is necessary for normal heart development. *Circ. Res.* 2000;86(9):932-8.

Lee, H.Y., M. Kléber, L. Hari, V. Brault, U. Suter, M.M. Taketo, R. Kemler, and L. Sommer Instructive role of Wnt/β-catenin in sensory fate specification in neural crest stem cells. *Science*. 2004;303:1020–1023.

Lévy P, Vidaud D, Leroy K, Laurendeau I, Wechsler J, Bolasco G, Parfait B, Wolkenstein P, Vidaud M, Bièche I. Molecular profiling of malignant peripheral nerve sheath tumors associated with neurofibromatosis type 1, based on large-scale real-time RT-PCR. *Mol Cancer.* 2004;3:20.

Lewis PW, Müller MM, Koletsky MS, Cordero F, Lin S, Banaszynski LA, Garcia BA, Muir TW, Becher OJ, Allis CD. Inhibition of PRC2 activity by a gain-of-function H3 mutation found in pediatric glioblastoma. *Science*. 2013;340(6134):857-61.

Lewis, E. B.A gene complex controlling segmentation in Drosophila. *Nature* 1978;276:565-570.

Li C, Cheng Y, Gutmann DA, Mangoura D. Differential localization of the neurofibromatosis 1 (NF1) gene product, neurofibromin, with the F-actin or microtubule cytoskeleton during differentiation of telencephalic neurons. *Brain Res Dev Brain Res*. 2001;130(2):231-48.

Li F, Munchhof AM, White HA, Mead LE, Krier TR, Fenoglio A, Chen S, Wu X, Cai S, Yang FC, Ingram DA. Neurofibromin is a novel regulator of RAS-induced signals in primary vascular smooth muscle cells. Hum Mol Genet. 2006;15(11):1921-30.

Li G, Margueron R, Ku M, Chambon P, Bernstein BE, Reinberg D. Jarid2 and PRC2, partners in regulating gene expression. *Genes Dev.* 2010;24(4):368-80.

Li H, Ma X, Wang J, Koontz J, Nucci M, Sklar J. Effects of rearrangement and allelic exclusion of JJAZ1/SUZ12 on cell proliferation and survival. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(50):20001-6.

Lin YL, Lei YT, Hong CJ, Hsueh YP. Syndecan-2 induces filopodia and dendritic spine formation via the neurofibromin-PKA-Ena/VASP pathway. *J Cell Biol*. 2007;177(5):829-41.

Lin YL, Lei YT, Hong CJ, Hsueh YP. Syndecan-2 induces filopodia and dendritic spine formation via the neurofibromin-PKA-Ena/VASP pathway. *J Cell Biol.* 2007;177(5):829-41.

Ling BC, Wu J, Miller SJ, Monk KR, Shamekh R, Rizvi TA, Decourten-Myers G, Vogel KS, DeClue JE, Ratner N. Role for the epidermal growth factor receptor in neurofibromatosis-related peripheral nerve tumorigenesis. *Cancer Cell.* 2005 Jan;7(1):65-75.

Luscan A, Laurendeau I, Malan V, Francannet C, Odent S, Giuliano F, Lacombe D, Touraine R, Vidaud M, Pasmant E, *et al.* Mutations in SETD2 cause a novel overgrowth condition. *J Med Genet*. 2014;51(8):512-7.

Luscan A, Vidaud D, Ortonne N, Wolkenstein P, Vidaud M, Pasmant E. [PRC2 alterations in NF1-associated malignant peripheral nerve sheath tumors: schwann cells with no complex]. Med Sci (Paris). 2014;30(8-9):733-5.

MacDonald BT, Tamai K, He X. Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell.* 2009;17(1):9-26. Review.

Madanikia SA, Bergner A, Ye X, Blakeley JO. Increased risk of breast cancer in women with NF1. *Am J Med Genet A*. 2012;158A(12):3056-60.

Maertens O, Johnson B, Hollstein P, Frederick DT, Cooper ZA, Messiaen L, Bronson RT, McMahon M, Granter S, Flaherty K, *et al.* Elucidating distinct roles for NF1 in melanomagenesis. *Cancer Discov.* 2013;3(3):338-49.

Makishima H, Jankowska AM, Tiu RV, Szpurka H, Sugimoto Y, Hu Z, Sauntharajah Y, Guinta K, Keddache MA, Putnam P, *et al.* Novel homo- and hemizygous mutations in EZH2 in myeloid malignancies. *Leukemia.* 2010;24(10):1799-804.

Malanchi I, Peinado H, Kassen D, Hussenet T, Metzger D, Chambon P, Huber M, Hohl D, Cano A, Birchmeier W, *et al.* Cutaneous cancer stem cell maintenance is dependent on beta-catenin signalling. *Nature.* 2008;452:650-3.

Mallen-St Clair J, Soydaner-Azeloglu R, Lee KE, Taylor L, Livanos A, Pylayeva-Gupta Y, Miller G, Margueron R, Reinberg D, Bar-Sagi D. EZH2 couples pancreatic regeneration to neoplastic progression. *Genes Dev*. 2012;26:439-44

Malumbres M, Barbacid M. RAS oncogenes: the first 30 years. *Nat Rev Cancer.* 2003;3(6):459-65.

Mangoura D, Sun Y, Li C, Singh D, Gutmann DH, Flores A, Ahmed M, Vallianatos G. Phosphorylation of neurofibromin by PKC is a possible molecular switch in EGF receptor signaling in neural cells. *Oncogene.* 2006;25(5):735-45.

Mangoura D, Sun Y, Li C, Singh D, Gutmann DH, Flores A, Ahmed M, Vallianatos G. Phosphorylation of neurofibromin by PKC is a possible molecular switch in EGF receptor signaling in neural cells. Oncogene. 2006 Feb 2;25(5):735-45.

Mansour AA, Gafni O, Weinberger L, Zviran A, Ayyash M, Rais Y, Krupalnik V, Zerbib M, Amann-Zalcenstein D, Maza I, et al. The H3K27 demethylase Utx regulates somatic and germ cell epigenetic reprogramming. *Nature.* 2012;488(7411):409-13.

Mantripragada KK, de Ståhl TD, Patridge C, Menzel U, Andersson R, Chuzhanova N, Kluwe L, Guha A, Mautner V, Dumanski JP, *et al.* Genome-wide high-resolution analysis of DNA copy number alterations in NF1-associated malignant peripheral nerve sheath tumors using 32K BAC array. *Genes Chromosomes Cancer* 2009;48:897-907.

Mantripragada KK, Spurlock G, Kluwe L, Chuzhanova N, Ferner RE, Frayling IM, Dumanski JP, Guha A, Mautner V, Upadhyaya M. High-resolution DNA copy number profiling of malignant peripheral nerve sheath tumors using targeted microarray-based comparative genomic hybridization. *Clin Cancer Res*. 2008;14(4):1015-24.

Margueron R, Li G, Sarma K, Blais A, Zavadil J, Woodcock CL, Dynlacht BD, Reinberg D. Ezh1 and Ezh2 maintain repressive chromatin through different mechanisms. *Mol Cell.* 2008;32(4):503-18.

Margueron R, Reinberg D. The Polycomb complex PRC2 and its mark in life. *Nature*. 2011;469(7330):343-9. Review.

Mark M, Rijli FM, Chambon P. Homeobox genes in embryogenesis and pathogenesis. *Pediatr Res.* 1997;42(4):421-9. Review.

Martin GA, Viskochil D, Bollag G, McCabe PC, Crosier WJ, Haubruck H, Conroy L, Clark R, O'Connell P, Cawthon RM, *et al.* The GAP-related domain of the neurofibromatosis type 1 gene product interacts with ras p21. *Cell* 1990;63:843-849.

Mautner VF, Kluwe L, Friedrich RE, Roehl AC, Bammert S, Högel J, Spöri H, Cooper DN, Kehrer-Sawatzki H. Clinical characterisation of 29 neurofibromatosis type-1 patients with molecularly ascertained 1.4 Mb type-1 NF1 deletions. *J Med Genet.* 2010;47(9):623-30.

Mawrin C, Kirches E, Boltze C, Dietzmann K, Roessner A, Schneider-Stock R. Immunohistochemical and molecular analysis of p53, RB, and PTEN in malignant peripheral nerve sheath tumors. *Virchows Arch*. 2002;440(6):610-5.

Mayes DA, Rizvi TA, Cancelas JA, Kolasinski NT, Ciraolo GM, Stemmer-Rachamimov AO, Ratner N. Perinatal or adult Nf1 inactivation using tamoxifen-inducible PlpCre each cause neurofibroma formation. *Cancer Res.* 2011;71(13):4675-85.

Maze I, Noh KM, Soshnev AA, Allis CD. Every amino acid matters: essential contributions of histone variants to mammalian development and disease. *Nat Rev Genet*. 2014;15(4):259-71.

McCabe MT, Ott HM, Ganji G, Korenchuk S, Thompson C, Van Aller GS, Liu Y, Graves AP, Della Pietra A 3rd, Diaz E, et al. EZH2 inhibition as a therapeutic strategy for lymphoma with EZH2-activating mutations. Nature. 2012;492(7427):108-12.

Mendenhall EM, Koche RP, Truong T, Zhou VW, Issac B, Chi AS, Ku M, Bernstein BE. GC-rich sequence elements recruit PRC2 in mammalian ES cells. *PLoS Genet*. 2010;6(12):e1001244.

Messiaen LM, Callens T, Mortier G, Beysen D, Vandenbroucke I, Van Roy N, Speleman F, Paepe AD. Exhaustive mutation analysis of the NF1 gene allows identification of 95% of mutations and reveals a high frequency of unusual splicing defects. *Hum Mutat.* 2000;15(6):541-55.

Micci F, Panagopoulos I, Bjerkehagen B, Heim S. Consistent rearrangement of chromosomal band 6p21 with generation of fusion genes JAZF1/PHF1 and EPC1/PHF1 in endometrial stromal sarcoma. *Cancer Res.* 2006;66(1):107-12.

Mikkelsen TS, Ku M, Jaffe DB, Issac B, Lieberman E, Giannoukos G, Alvarez P, Brockman W, Kim TK, Koche RP, *et al.* Genome-wide maps of chromatin state in pluripotent and lineage-committed cells. *Nature*. 2007;448(7153):553-60.

Miller SJ, Rangwala F, Williams J, Ackerman P, Kong S, Jegga AG, Kaiser S, Aronow BJ, Frahm S, Kluwe L, *et al*. Large-scale molecular comparison of human schwann cells to malignant peripheral nerve sheath tumor cell lines and tissues. *Cancer Res.* 2006;66(5):2584-91.

Minajigi A, Froberg JE, Wei C, Sunwoo H, Kesner B, Colognori D, Lessing D, Payer B, Boukhali M, Haas W, *et al.* Chromosomes. A comprehensive Xist interactome reveals cohesin repulsion and an RNA-directed chromosome conformation. *Science.* 2015;349(6245).

Mitin N, Rossman KL, Der CJ. Signaling interplay in Ras superfamily function. *Curr Biol*. 2005;15(14):R563-74. Review.

Mo W, Chen J, Patel A, Zhang L, Chau V, Li Y, Cho W, Lim K, Xu J, Lazar AJ, *et al.* CXCR4/CXCL12 mediate autocrine cell- cycle progression in NF1-associated malignant peripheral nerve sheath tumors. *Cell.* 2013;152(5):1077-90.

Mochizuki-Kashio M, Aoyama K, Sashida G, Oshima M, Tomioka T, Muto T, Wang C, Iwama A. Ezh2 loss in hematopoietic stem cells predisposes mice to develop heterogeneous malignancies in an Ezh1-dependent manner. Blood. 2015;126(10):1172-83.

Mohn F, Weber M, Rebhan M, Roloff TC, Richter J, Stadler MB, Bibel M, Schübeler D. Lineage-specific polycomb targets and de novo DNA methylation define restriction and potential of neuronal progenitors. *Mol Cell.* 2008;30(6):755-66.

Montgomery ND, Yee D, Montgomery SA, Magnuson T. Molecular and functional mapping of EED motifs required for PRC2-dependent histone methylation. *J Mol Biol.* 2007;374(5):1145-57.

Morin RD, Johnson NA, Severson TM, Mungall AJ, An J, Goya R, Paul JE, Boyle M, Woolcock BW, Kuchenbauer F, et al. Somatic mutations altering EZH2 (Tyr641) in follicular and diffuse large B-cell lymphomas of germinal-center origin. *Nat. Genet.* 2010;42(2):181-5.

Motoyama J, Kitajima K, Kojima M, Kondo S, and Takeuchi T. Organogenesis of the liver, thymus and spleen is affected in jumonji mutant mice. *Mech. Dev.* 1997;66(1-2):27-37.

Mousley CJ, Tyeryar KR, Ryan MM, Bankaitis VA. Sec14p-like proteins regulate phosphoinositide homoeostasis and intracellular protein and lipid trafficking in yeast. *Biochem Soc Trans*. 2006;34(Pt 3):346-50.

Munchhof AM, Li F, White HA, Mead LE, Krier TR, Fenoglio A, Li X, Yuan J, Yang FC, Ingram DA. Neurofibroma-associated growth factors activate a distinct signaling network to alter the function of neurofibromin-deficient endothelial cells. *Hum Mol Genet.* 2006;15(11):1858-69.

Musselman CA, Avvakumov N, Watanabe R, Abraham CG, Lalonde ME, Hong Z, Allen C, Roy S, Nuñez JK, Nickoloff J, *et al.* Molecular basis for H3K36me3 recognition by the Tudor domain of PHF1. *Nat Struct Mol Biol*. 2012;19(12):1266-72.

Mussotter T, Bengesser K, Högel J, Cooper DN, Kehrer-Sawatzki H. Population-specific differences in gene conversion patterns between human SUZ12 and SUZ12P are indicative of the dynamic nature of interparalog gene conversion. *Hum Genet.* 2014;133(4):383-401.

Muto T, Sashida G, Oshima M, Wendt GR, Mochizuki-Kashio M, Nagata Y, Sanada M, Miyagi S, Saraya A, Kamio A, et al. Concurrent loss of Ezh2 and Tet2 cooperates in the pathogenesis of myelodysplastic disorders. *J Exp Med*. 2013;210(12):2627-39.

Nègre N, Hennetin J, Sun LV, Lavrov S, Bellis M, White KP, Cavalli G. Chromosomal distribution of PcG proteins during Drosophila development. *PLoS Biol*. 2006 Jun;4(6):e170.

Nekrasov M, Klymenko T, Fraterman S, Papp B, Oktaba K, Köcher T, Cohen A, Stunnenberg HG, Wilm M, Müller J. Pcl-PRC2 is needed to generate high levels of H3-K27 trimethylation at Polycomb target genes. *EMBO J.* 2007;26(18):4078-88.

Nekrasov M, Wild B, and Muller J. Nucleosome binding and histone methyltransferase activity of Drosophila PRC2. *EMBO Rep.* 2005;6(4):348-53.

Niehrs C. The complex world of WNT receptor signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012;13(12):767-79. Review.

Nielsen GP, Stemmer-Rachamimov AO, Ino Y, Moller MB, Rosenberg AE, Louis DN. Malignant transformation of neurofibromas in neurofibromatosis 1 is associated with CDKN2A/p16 inactivation. *Am J Pathol*. 1999;155(6):1879-84.

Nikbakht H, Panditharatna E, Mikael LG, Li R, Gayden T, Osmond M, Ho CY, Kambhampati M, Hwang EI, Faury D, *et al*. Spatial and temporal homogeneity of driver mutations in diffuse intrinsic pontine glioma. Nat Commun. 2016;7:11185.

Nikoloski G, Langemeijer SM, Kuiper RP, Knops R, Massop M, Tönnissen ER, van der Heijden A, Scheele TN, Vandenberghe P, de Witte T, et al. Somatic mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myelodysplastic syndromes. Nat.Genet. 2010;42(8):665-7.

Nissan MH, Pratilas CA, Jones AM, Ramirez R, Won H, Liu C, Tiwari S, Kong L, Hanrahan AJ, Yao Z, *et al.* Loss of NF1 in cutaneous melanoma is associated with RAS activation and MEK dependence. *Cancer Res.* 2014;74(8):2340-50.

Ntziachristos P, Tsirigos A, Van Vlierberghe P, Nedjic J, Trimarchi T, Flaherty MS, Ferres-Marco D, da Ros V, Tang Z, Siegle J, et al. Genetic inactivation of the polycomb repressive complex 2 in T cell acute lymphoblastic leukemia. Nat Med. 2012;18(2):298-301.

O'Carroll D, Erhardt S, Pagani M, Barton SC, Surani MA, Jenuwein T. The polycomb-group gene Ezh2 is required for early mouse development. *Mol Cell Biol.* 2001;21(13):4330-6.

O'Meara MM, Simon JA. Simon and Kingston. Inner workings and regulatory inputs that control Polycomb repressive complex 2. *Chromosoma*. 2012;121(3):221-34.

Oliveira AF, Yasuda R. Neurofibromin is the major ras inactivator in dendritic spines. *J Neurosci.* 2014;34(3):776-83.

Ozawa T, Araki N, Yunoue S, Tokuo H, Feng L, Patrakitkomjorn S, Hara T, Ichikawa Y, Matsumoto K, Fujii K, *et al.* The neurofibromatosis type 1 gene product neurofibromin enhances cell motility by regulating actin filament dynamics via the Rho-ROCK-LIMK2-cofilin pathway.*J Biol Chem.* 2005 Nov 25;280(47):39524-33.

Padmanabhan A, Lee JS, Ismat FA, Lu MM, Lawson ND, Kanki JP, Look AT, Epstein JA. Cardiac and vascular functions of the zebrafish orthologues of the type I neurofibromatosis gene NFI. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(52):22305-10.

Panagopoulos I, Micci F, Thorsen J, Gorunova L, Eibak AM, Bjerkehagen B, Davidson B, Heim S. Novel fusion of MYST/Esa1-associated factor 6 and PHF1 in endometrial stromal sarcoma. *PLoS One.* 2012;7(6):e39354.

Parrinello S, Lloyd AC. Neurofibroma development in NF1--insights into tumour initiation. *Trends Cell Biol.* 2009;19:395-403.

Pasini D, Bracken AP, Jensen MR, Lazzerini Denchi E, Helin K. Suz12 is essential for mouse development and for EZH2 histone methyltransferase activity. *EMBO J*. 2004;23(20):4061-71.

Pasini D, Cloos PA, Walfridsson J, Olsson L, Bukowski JP, Johansen JV, Bak M, Tommerup N, Rappsilber J, Helin K. JARID2 regulates binding of the Polycomb repressive complex 2 to target genes in ES cells. *Nature*. 2010;464(7286):306-10.

Pasmant E, Parfait B, Luscan A, Goussard P, Briand-Suleau A, Laurendeau I, Fouveaut C, Leroy C, Montadert A, Wolkenstein P, Vidaud M, Vidaud D. Neurofibromatosis type 1 molecular diagnosis: what can NGS do for you when you have a large gene with loss of function mutations? *Eur J Hum Genet.* 2015;23(5):596-601

Pasmant E, Sabbagh A, Masliah-Planchon J, Ortonne N, Laurendeau I, Melin L, Ferkal S, Hernandez L, Leroy K, Valeyrie-Allanore L, *et al.* Role of noncoding RNA ANRIL in genesis of plexiform neurofibromas in neurofibromatosis type 1. *J Natl Cancer Inst*. 2011;103(22):1713-22.

Pasmant E, Sabbagh A, Spurlock G, Laurendeau I, Grillo E, Hamel MJ, Martin L, Barbarot S, Leheup B, Rodriguez D, *et al*. NF1 microdeletions in neurofibromatosis type 1: from genotype to phenotype. *Hum Mutat.* 2010;31(6):E1506-18.

Pasmant E, Sabbagh A, Vidaud M, Bièche I. ANRIL, a long, noncoding RNA, is an unexpected major hotspot in GWAS. FASEB J. *2011*;25(2):444-8.

Pasmant E, Vidaud M, Vidaud D, Wolkenstein P. Neurofibromatosis type 1: from genotype to phenotype. *J Med Genet.* 2012;49(8):483-9. Review.

Patrakitkomjorn S, Kobayashi D, Morikawa T, Wilson MM, Tsubota N, Irie A, Ozawa T, Aoki M, Arimura N, Kaibuchi K, Saya H, Araki N Neurofibromatosis type 1 (NF1) tumor suppressor, neurofibromin, regulates the neuronal differentiation of PC12 cells via its associating protein, CRMP-2. *The Journal of biological chemistry* 2008;283:9399- 9413.

Pekmezci M, Reuss DE, Hirbe AC, Dahiya S, Gutmann DH, von Deimling A, Horvai AE, Perry A. Morphologic and immunohistochemical features of malignant peripheral nerve sheath tumors and cellular schwannomas. *Mod Pathol.* 2015;28(2):187-200.

Peng JC, Valouev A, Swigut T, Zhang J, Zhao Y, Sidow A, Wysocka J. Jarid2/Jumonji coordinates control of PRC2 enzymatic activity and target gene occupancy in pluripotent cells. *Cell.* 2009;139(7):1290-302.

Pereira JD, Sansom SN, Smith J, Dobenecker MW, Tarakhovsky A, Livesey FJ. Ezh2, the histone methyltransferase of PRC2, regulates the balance between self-renewal and differentiation in the cerebral cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(36):15957-62.

Perrone F, Tabano S, Colombo F, Dagrada G, Birindelli S, Gronchi A, Colecchia M, Pierotti MA, Pilotti S. p15INK4b, p14ARF, and p16INK4a inactivation in sporadic and neurofibromatosis type 1-related malignant peripheral nerve sheath tumors. *Clin Cancer Res.* 2003;9(11):4132-8.

Persad S, Attwell S, Gray V, Mawji N, Deng JT, Leung D, Yan J, Sanghera J, Walsh MP, Dedhar S. Regulation of protein kinase B/Akt-serine 473 phosphorylation by integrin-linked kinase: critical roles for kinase activity and amino acids arginine 211 and serine 343. *J Biol Chem.* 2001;276(29):27462-9.

Phan VT, Ding VW, Li F, Chalkley RJ, Burlingame A, McCormick F The RasGAP proteins Ira2 and neurofibromin are negatively regulated by Gpb1 in yeast and ETEA in humans. *Molecular and cellular biology* 2010;30:2264-2279.

Pinson S, Wolkenstein P. Neurofibromatosis type 1 or Von Recklinghausen's disease. *Rev Med Interne* 2005;26:196-215.

Piunti A, Shilatifard A. Epigenetic balance of gene expression by Polycomb and COMPASS families. *Science.* 2016;352:aad9780. Review.

Plath K, Fang J, Mlynarczyk-Evans SK, Cao R, Worringer KA, Wang H, de la Cruz CC, Otte AP, Panning B, Zhang Y. Role of histone H3 lysine 27 methylation in X inactivation. *Science.* 2003;300(5616):131-5.

Polyak K, Hahn WC. Roots and stems: stem cells in cancer. *Nat Med.* 2006;12(3):296-300.

Polyak K, Weinberg RA. Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat Rev Cancer.* 2009;9:265-73.

Prieto-Granada CN, Wiesner T, Messina JL, Jungbluth AA, Chi P, Antonescu CR. Loss of H3K27me3 Expression Is a Highly Sensitive Marker for Sporadic and Radiation-induced MPNST. *Am J Surg Pathol.* 2016;40(4):479-89.

Qi C, Liu S, Qin R, Zhang Y, Wang G, Shang Y, Wang Y, Liang J. Coordinated regulation of dendrite arborization by epigenetic factors CDYL and EZH2. *J Neurosci.* 2014;34(13):4494-508.

Qi L, Cao JL, Hu Y, Yang JG, Ji Y, Huang J, Zhang Y, Sun DG, Xia HF, Ma X. The dynamics of polycomb group proteins in early embryonic nervous system in mouse and human. *Int J Dev Neurosci*. 2013;31(7):487-95.

Rahrmann EP, Watson AL, Keng VW, Choi K, Moriarity BS, Beckmann DA, Wolf NK, Sarver A, Collins MH, Moertel CL, *et al*. Forward genetic screen for malignant peripheral nerve sheath tumor formation identifies new genes and pathways driving tumorigenesis. *Nat Genet.* 2013;45(7):756-66.

Rai K, Pilarski R, Cebulla CM, Abdel-Rahman MH. Comprehensive review of BAP1 tumor predisposition syndrome with report of two new cases. *Clin Genet.* 2016;89(3):285-94.

Ramaswamy V, Remke M, Taylor MD. An epigenetic therapy for diffuse intrinsic pontine gliomas. *Nat Med*. 2014;20(12):1378-9.

Ratner N, Miller SJ. A RASopathy gene commonly mutated in cancer: the neurofibromatosis type 1 tumour suppressor. *Nat Rev Cancer.* 2015;15:290-301. Review.

Rauen KA. The RASopathies. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2013;14:355-69.

Reilly KM. Extending the convergence of canonical WNT signaling and classic cancer pathways for treatment of malignant peripheral nerve sheath tumors. *Cancer Discov.* 2013;3(6):610-2.

Reilly KM. Neurofibromatosis and lessons for the war on cancer. *EMBO Mol Med*. 2009;1(4):198-200.

Reya T, Clevers H. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature.* 2005;434(7035):843-50. Review.

Riccardi VM. Type 1 neurofibromatosis and the pediatric patient. *Curr Probl Pediatr.* 1992;22(2):66-106. Review.

Riising EM, Comet I, Leblanc B, Wu X, Johansen JV, Helin K. Gene silencing triggers polycomb repressive complex 2 recruitment to CpG islands genome wide. *Mol Cell.* 2014;55(3):347-60.

Ringrose L, Rehmsmeier M, Dura JM, Paro R. Genome-wide prediction of Polycomb/Trithorax response elements in Drosophila melanogaster. *Dev Cell*. 2003;5(5):759-71.

Rodon J, Dienstmann R, Serra V, Tabernero J. Development of PI3K inhibitors: lessons learned from early clinical trials. *Nat Rev Clin Oncol.* 2013;10(3):143-53. Review.

Rodriguez FJ, Folpe AL, Giannini C, Perry A. Pathology of peripheral nerve sheath tumors: diagnostic overview and update on selected diagnostic problems. *Acta Neuropathol*. 2012;123(3):295-319.

Röhrich M, Koelsche C, Schrimpf D, Capper D, Sahm F, Kratz A, Reuss J, Hovestadt V, Jones DT, Bewerunge-Hudler M, *et al.* Methylation-based classification of benign and malignant peripheral nerve sheath tumors. *Acta Neuropathol.* 2016;131(6):877-87.

Ronan JL, Wu W, Crabtree GR. From neural development to cognition: unexpected roles for chromatin. *Nat Rev Genet.* 2013;14(5):347-59.

Rossman KL, Der CJ, Sondek J. GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005;6(2):167-80. Review.

Ryan JJ, Klein KA, Neuberger TJ, Leftwich JA, Westin EH, Kauma S, Fletcher JA, DeVries GH, Huff TF. Role for the stem cell factor/KIT complex in Schwann cell neoplasia and mast cell proliferation associated with neurofibromatosis. *J Neurosci Res.* 1994;37(3):415-32.

Sabbagh A, Pasmant E, Laurendeau I, Parfait B, Barbarot S, Guillot B, Combemale P, Ferkal S, Vidaud M, Aubourg P, Vidaud D, Wolkenstein P; members of the NF France Network. Unravelling the genetic basis of variable clinical expression in neurofibromatosis 1. *Hum Mol Genet.* 2009;18(15):2768-78.

Sakaguchi H, Okuno Y, Muramatsu H, Yoshida K, Shiraishi Y, Takahashi M, Kon A, Sanada M, Chiba K, Tanaka H, *et al.* Exome sequencing identifies secondary mutations of SETBP1 and JAK3 in juvenile myelomonocytic leukemia. *Nat Genet.* 2013;45(8):937-41.

Samatar AA, Poulikakos PI. Targeting RAS-ERK signalling in cancer: promises and challenges. *Nat Rev Drug Discov.* 2014;13(12):928-42. Review

Sanulli S, Justin N, Teissandier A, Ancelin K, Portoso M, Caron M, Michaud A, Lombard B, da Rocha ST, Offer J, *et al.* Jarid2 Methylation via the PRC2 Complex Regulates H3K27me3 Deposition during Cell Differentiation. *Mol Cell.* 2015;57(5):769-83.

Sarma K, Margueron R, Ivanov A, Pirrotta V & Reinberg D. Ezh2 requires PHF1 to efficiently catalyze H3 lysine 27 trimethylation in vivo. *Mol. Cell. Biol.* 2008;28(8):2718-31.

Sarma K, Reinberg D. Histone variants meet their match. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005;6(2):139-49. Review.

Sashida G, Harada H, Matsui H, Oshima M, Yui M, Harada Y, Tanaka S, Mochizuki-Kashio M, Wang C, Saraya A, *et al.* Ezh2 loss promotes development of myelodysplastic syndrome but attenuates its predisposition to leukaemic transformation. *Nat Commun.* 2014;5:4177.

Sauvageau M, Sauvageau G. Polycomb group proteins: multi-faceted regulators of somatic stem cells and cancer. *Cell Stem Cell*. 2010;7(3):299-313. Review.

Schaefer IM, Fletcher CD, Hornick JL. Loss of H3K27 trimethylation distinguishes malignant peripheral nerve sheath tumors from histologic mimics. *Mod Pathol.* 2016;29(1):4-13.

Scheuermann JC, de Ayala Alonso AG, Oktaba K, Ly-Hartig N, McGinty RK, Fraterman S, Wilm M, Muir TW, Müller J. Histone H2A deubiquitinase activity of the Polycomb repressive complex PR-DUB. *Nature.* 2010;465(7295):243-7.

Schmitges FW, Prusty AB, Faty M, Stützer A, Lingaraju GM, Aiwazian J, Sack R, Hess D, Li L, Zhou S et al. Histone methylation by PRC2 is inhibited by active chromatin marks. *Mol Cell.* 2011;42:330-41.

Schoeftner S, Sengupta AK, Kubicek S, Mechtler K, Spahn L, Koseki H, Jenuwein T, Wutz A. Recruitment of PRC1 function at the initiation of X inactivation independent of PRC2 and silencing. *EMBO J.* 2006;25(13):3110-22.

Schorderet P, Duboule D. Structural and functional differences in the long non-coding RNA hotair in mouse and human. *PLoS Genet.* 2011;7(5):e1002071.

Schubbert S, Shannon K, Bollag G. Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. *Nat Rev Cancer.* 2007;7(4):295-308. Review.

Schuettengruber B, Cavalli G. Recruitment of polycomb group complexes and their role in the dynamic regulation of cell fate choice. *Development.* 2009;136(21):3531-42. Review.

Schuettengruber B, Chourrout D, Vervoort M, Leblanc B, Cavalli G. Genome regulation by polycomb and trithorax proteins. *Cell.* 2007;128(4):735-45. Review.

Schumacher A, Faust C, and Magnuson T. Positional cloning of a global regulator of anterior-posterior patterning in mice. *Nature.* 1996;384(6610):648.

Schwartz YB, Pirrotta V. A new world of Polycombs: unexpected partnerships and emerging functions. Nat Rev Genet. 2013;14(12):853-64. Review.

Schwartz YB, Pirrotta V. Polycomb silencing mechanisms and the management of genomic programmes. *Nat Rev Genet*. 2007;8(1):9-22. Review.

Schwartzentruber J, Korshunov A, Liu XY, Jones DT, Pfaff E, Jacob K, Sturm D, Fontebasso AM, Quang DA, Tönjes M, *et al*. Driver mutations in histone H3.3 and chromatin remodelling genes in paediatric glioblastoma. *Nature*. 2012;482(7384):226-31.

Serra E, Rosenbaum T, Nadal M, Winner U, Ars E, Estivill X, Lázaro C. Mitotic recombination effects homozygosity for NF1 germline mutations in neurofibromas. *Nat Genet*. 2001;28:294-6.

Seshagiri S, Stawiski EW, Durinck S, Modrusan Z, Storm EE, Conboy CB, Chaudhuri S, Guan Y, Janakiraman V, Jaiswal BS, *et al.* Recurrent R-spondin fusions in colon cancer. *Nature.* 2012;488(7413):660-4.

Sestini R, Bacci C, Provenzano A, Genuardi M, Papi L. Evidence of a four-hit mechanism involving SMARCB1 and NF2 in schwannomatosis-associated schwannomas. *Hum Mutat.* 2008;29(2):227-31.

Shah N, Sukumar S. The Hox genes and their roles in oncogenesis. *Nat Rev Cancer.* 2010;10(5):361-71. Review.

Sharpless NE, Sherr CJ. Forging a signature of in vivo senescence. *Nat Rev Cancer*. 2015;15(7):397-408.

Shen X, Kim W, Fujiwara Y, Simon MD, Liu Y, Mysliwiec MR, Yuan GC, Lee Y, Orkin SH. Jumonji modulates polycomb activity and self-renewal versus differentiation of stem cells. *Cell.* 2009;139(7):1303-14.

Shen X, Liu Y, Hsu YJ, Fujiwara Y, Kim J, Mao X, Yuan GC, Orkin SH. EZH1 mediates methylation on histone H3 lysine 27 and complements EZH2 in maintaining stem cell identity and executing pluripotency. Mol *Cell.* 2008;32(4):491-502.

Shilyansky C, Lee YS, Silva AJ. Molecular and Cellular Mechanisms of Learning Disabilities: A Focus on NF1. *Annu Rev Neurosci*. 2010;33:221-43.

Shin J, Padmanabhan A, de Groh ED, Lee JS, Haidar S, Dahlberg S, Guo F, He S, Wolman MA, Granato M, *et al.* Zebrafish neurofibromatosis type 1 genes have redundant functions in tumorigenesis and embryonic development. *Dis Model Mech*. 2012;5(6):881-94.

Silva J, Mak W, Zvetkova I, Appanah R, Nesterova TB, Webster Z, Peters AH, Jenuwein T, Otte AP, Brockdorff N. Establishment of histone h3 methylation on the inactive X chromosome requires transient recruitment of Eed-Enx1 polycomb group complexes. *Dev Cell.* 2003;4(4):481-95.

Simon C, Chagraoui J, Krosl J, Gendron P, Wilhelm B, Lemieux S, Boucher G, Chagnon P, Drouin S, Lambert R, *et al*. A key role for EZH2 and associated genes in mouse and human adult T-cell acute leukemia. *Genes Dev*. 2012;26(7):651-6.

Simon JA, Kingston RE. Mechanisms of polycomb gene silencing: knowns and unknowns. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009;10(10):697-708. Review.

Simon JA, Kingston RE. Occupying chromatin: Polycomb mechanisms for getting to genomic targets, stopping transcriptional traffic, and staying put. *Mol Cell.* 2013;49(5):808-24. Review.

Sing A, Pannell D, Karaiskakis A, Sturgeon K, Djabali M, Ellis J, Lipshitz HD, Cordes SP. A vertebrate Polycomb response element governs segmentation of the posterior hindbrain. Cell. 2009 Sep 4;138(5):885-97.

Sneeringer CJ, Scott MP, Kuntz KW, Knutson SK, Pollock RM, Richon VM, Copeland RA. Coordinated activities of wild-type plus mutant EZH2 drive tumor-associated hypertrimethylation of lysine 27 on histone H3 (H3K27) in human B-cell lymphomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 ;107(49):20980-5.

Song J, Wang GG. An H3K36 methylation-engaging Tudor motif of polycomb-like proteins mediates PRC2 complex targeting. *Mol Cell*. 2013;49(3):571-82.

Souroullas GP, Jeck WR, Parker JS, Simon JM, Liu JY, Paulk J, Xiong J, Clark KS, Fedoriw Y, Qi J, Burd CE, *et al.* An oncogenic Ezh2 mutation induces tumors through global redistribution of histone 3 lysine 27 trimethylation. *Nat Med.* 2016;22(6):632-40.

Sparmann A, van Lohuizen M. Polycomb silencers control cell fate, development and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2006;6(11):846-56.

Staser K, Yang FC, Clapp DW. Mast cells and the neurofibroma microenvironment. *Blood.* 2010;116(2):157-64.

Steinmann K, Cooper DN, Kluwe L, Chuzhanova NA, Senger C, Serra E, Lazaro C, Gilaberte M, Wimmer K, Mautner VF, Kehrer-Sawatzki H. Type 2 NF1 deletions are highly unusual by virtue of the absence of nonallelic homologous recombination hotspots and an apparent preference for female mitotic recombination. *Am J Hum Genet.* 2007;81:1201-20.

Steinmann K, Kluwe L, Friedrich RE, Mautner VF, Cooper DN, Kehrer-Sawatzki H. Mechanisms of loss of heterozygosity in neurofibromatosis type 1-associated plexiform neurofibromas. *J Invest Dermatol.* 2009;129(3):615-21.

Stephens K, Weaver M, Leppig KA, Maruyama K, Emanuel PD, Le Beau MM, Shannon KM. Interstitial uniparental isodisomy at clustered breakpoint intervals is a frequent mechanism of NF1 inactivation in myeloid malignancies. *Blood*. 2006;108(5):1684-9.

Stieglitz E, Taylor-Weiner AN, Chang TY, Gelston LC, Wang YD, Mazor T, Esquivel E, Yu A, Seepo S, Olsen SR, *et al.* The genomic landscape of juvenile myelomonocytic leukemia. *Nat Genet.* 2015;47(11):1326-33.

Storchová Z, Kloosterman WP. The genomic characteristics and cellular origin of chromothripsis. *Curr Opin Cell Biol*. 2016;40:106-13.

Stowe IB, Mercado EL, Stowe TR, Bell EL, Oses-Prieto JA, Hernandez H, Burlingame AL, McCormick F A shared molecular mechanism underlies the human rasopathies Legius syndrome and Neurofibromatosis-1. *Genes Dev* 2012;26:1421-1426.

Struhl G, Akam M. Altered distributions of Ultrabithorax transcripts in extra sex combs mutant embryos of Drosophila. *EMBO J.* 1985;4(12):3259-64.

Sturm D, Witt H, Hovestadt V, Khuong-Quang DA, Jones DT, Konermann C, Pfaff E, Tönjes M, Sill M, Bender S, *et al*. Hotspot mutations in H3F3A and IDH1 define distinct epigenetic and biological subgroups of glioblastoma. *Cancer Cell*. 2012;22(4):425-37.

Suganuma T, Pattenden SG, Workman JL. Diverse functions of WD40 repeat proteins in histone recognition. *Genes Dev.* 2008;22(10):1265-8.

Tachibana M, Sugimoto K, Fukushima T, Shinkai Y. Set domain-containing protein, G9a, is a novel lysine-preferring mammalian histone methyltransferase with hyperactivity and specific selectivity to lysines 9 and 27 of histone H3. *J Biol Chem.* 2001;276:25309-17.

Takeuchi T, Kojima M, Nakajima K, and Kondo S. jumonji gene is essential for the neurulation and cardiac development of mouse embryos with a C3H/He background. *Mech. Dev*. 1999;86(1-2):29-38.

Takeuchi T, Yamazaki Y, Katoh-Fukui Y, Tsuchiya R, Kondo S, Motoyama J, and Higashinakagawa T. Gene trap capture of a novel mouse gene, jumonji, required for neural tube formation. *Genes Dev.* 1995;9(10):1211-22.

Tan H, Bao J, Zhou X Genome-wide mutational spectra analysis reveals significant cancer-specific heterogeneity. Sci Rep. *2015*;5:12566.

Tan M, Zhao Y, Kim SJ, Liu M, Jia L, Saunders TL, Zhu Y, Sun Y SAG/RBX2/ROC2 E3 ubiquitin ligase is essential for vascular and neural development by targeting NF1 for degradation. *Dev Cell* 2011;21:1062-1076.

Tanaka K, Matsumoto K, Toh-E A. IRA1, an inhibitory regulator of the RAS-cyclic AMP pathway in Saccharomyces cerevisiae. *Mol Cell Biol.* 1989;9(2):757-68.

Tanaka K, Nakafuku M, Tamanoi F, Kaziro Y, Matsumoto K, Toh-e A. IRA2, a second gene of Saccharomyces cerevisiae that encodes a protein with a domain homologous to mammalian ras GTPase-activating protein. *Mol Cell Biol.* 1990;10(8):4303-13.

Tatton-Brown K, Hanks S, Ruark E, Zachariou A, Duarte Sdel V, Ramsay E, Snape K, Murray A, Perdeaux ER, Seal S, *et al.* Germline mutations in the oncogene EZH2 cause Weaver syndrome and increased human height. *Oncotarget.* 2011;2(12):1127-33.

Tatton-Brown K, Murray A, Hanks S, Douglas J, Armstrong R, Banka S, Bird LM, Clericuzio CL, Cormier-Daire V, Cushing T, et al. Weaver syndrome and EZH2 mutations: Clarifying the clinical phenotype. *Am J Med Genet A*. 2013;161A(12):2972-80.

Tatton-Brown K, Seal S, Ruark E, Harmer J, Ramsay E, Del Vecchio Duarte S, Zachariou A, Hanks S, O'Brien E, *et al.* Mutations in the DNA methyltransferase gene DNMT3A cause an overgrowth syndrome with intellectual disability. *Nat Genet.* 2014;46(4):385-8.

The I, Hannigan GE, Cowley GS, Reginald S, Zhong Y, Gusella JF, Hariharan IK, Bernards A (1997) Rescue of Drosophila NF1 mutant phenotype by protein kinase A. *Science* 276:791–794

Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell.* 2009;139(5):871-90. Review.

Thomas L, Kluwe L, Chuzhanova N, Mautner V, Upadhyaya M. Analysis of NF1 somatic mutations in cutaneous neurofibromas from patients with high tumor burden. *Neurogenetics* 2010;11(4):391-400.

Thomas SL, Deadwyler GD, Tang J, Stubbs EB Jr, Muir D, Hiatt KK, Clapp DW, De Vries GH. Reconstitution of the NF1 GAP-related domain in NF1-deficient human Schwann cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;348(3):971-80.

Tie F, Banerjee R, Stratton CA, Prasad-Sinha J, Stepanik V, Zlobin A, Diaz MO, Scacheri PC, Harte PJ. CBP-mediated acetylation of histone H3 lysine 27 antagonizes Drosophila Polycomb silencing. *Development.* 2009;136(18):3131-41.

Tie F, Stratton CA, Kurzhals RL, Harte PJ. The N terminus of Drosophila ESC binds directly to histone H3 and is required for E(Z)-dependent trimethylation of H3 lysine 27. *Mol Cell Biol.* 2007;27(6):2014-26.

Timp W, Feinberg AP. Cancer as a dysregulated epigenome allowing cellular growth advantage at the expense of the host. *Nat Rev Cancer.* 2013;13(7):497-510.

Tokuo H, Yunoue S, Feng L, Kimoto M, Tsuji H, Ono T, Saya H, Araki N Phosphorylation of neurofibromin by cAMP- dependent protein kinase is regulated via a cellular association of N(G),N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *FEBS letters* 2001;494:48-53.

Tolhuis B, de Wit E, Muijrers I, Teunissen H, Talhout W, van Steensel B, van Lohuizen M. Genome-wide profiling of PRC1 and PRC2 Polycomb chromatin binding in Drosophila melanogaster. *Nat Genet.* 2006;38(6):694-9.

Tong J, Hannan F, Zhu Y, Bernards A, Zhong Y. Neurofibromin regulates G protein-stimulated adenylyl cyclase activity. *Nat Neurosci.* 2002;5(2):95-6.

Topilko P. [Boundary cap cells--a nest of neural stem cells in the peripheral nervous system]. *Bull Acad Natl Med*. 2007;191(7):1383-92 Review. French.

Trovó-Marqui AB, Tajara EH. Neurofibromin: a general outlook. *Clin Genet*. 2006;70:1-13.

Tsai MC, Manor O, Wan Y, Mosammaparast N, Wang JK, Lan F, Shi Y, Segal E, Chang HY. Long noncoding RNA as modular scaffold of histone modification complexes. Science. 2010;329(5992):689-93.

Upadhyaya M, Kluwe L, Spurlock G, Monem B, Majounie E, Mantripragada K, Ruggieri M, Chuzhanova N, Evans DG, Ferner R et al. Germline and somatic NF1 gene mutation spectrum in NF1-associated malignant peripheral nerve sheath tumors (MPNSTs). *Hum Mutat.* 2008;29(1):74-82.

Upadhyaya M, Spurlock G, Monem B, Thomas N, Friedrich RE, Kluwe L, Mautner V. Germline and somatic NF1 gene mutations in plexiform neurofibromas. *Hum Mutat.* 2008;29(8):E103-11

Upadhyaya M, Spurlock G, Thomas L, Thomas NS, Richards M, Mautner VF, Cooper DN, Guha A, Yan J. Microarray-based copy number analysis of neurofibromatosis type-1 (NF1)-associated malignant peripheral nerve sheath tumors reveals a role for Rho-GTPase pathway genes in NF1 tumorigenesis. *Hum Mutat.* 2012;33(4):763-76.

Valentin T, Le Cesne A, Ray-Coquard I, Italiano A, Decanter G, Bompas E, Isambert N, Thariat J, Linassier C, Bertucci F, *et al*. Management and prognosis of malignant peripheral nerve sheath tumors: The experience of the French Sarcoma Group (GSF-GETO). *Eur J Cancer.* 2016;56:77-84.

Vallee B, Doudeau M, Godin F, Gombault A, Tchalikian A, de Tauzia ML, Benedetti H Nf1 RasGAP inhibition of LIMK2 mediates a new cross-talk between Ras and Rho pathways. *PLoS One* 2012;7:e47283.

Vallée B, Doudeau M, Godin F, Gombault A, Tchalikian A, de Tauzia ML, Bénédetti H. Nf1 RasGAP inhibition of LIMK2 mediates a new cross-talk between Ras and Rho pathways. *PLoS One.* 2012;7(10):e47283.

Van Allen EM, Mouw KW, Kim P, Iyer G, Wagle N, Al-Ahmadie H, Zhu C, Ostrovnaya I, Kryukov GV, O'Connor KW, *et al*. Somatic ERCC2 mutations correlate with cisplatin sensitivity in muscle-invasive urothelial carcinoma. *Cancer Discov.* 2014;4(10):1140-53.

Van Asperen CJ, Overweg-Plandsoen WC, Cnossen MH, van Tijn DA, Hennekam RC. Familial neurofibromatosis type 1 associated with an overgrowth syndrome resembling Weaver syndrome. *J Med Genet.* 1998;35(4):323-7.

Van der Meulen J, Sanghvi V, Mavrakis K, Durinck K, Fang F, Matthijssens F, Rondou P, Rosen M, Pieters T, Vandenberghe P, *et al.* The H3K27me3 demethylase UTX is a gender-specific tumor suppressor in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 2015;125(1):13-21.

Van Haaften G, Dalgliesh GL, Davies H, Chen L, Bignell G, Greenman C, Edkins S, Hardy C, O'Meara S, Teague J, *et al*. Somatic mutations of the histone H3K27 demethylase gene UTX in human cancer. *Nat Genet*. 2009;41(5):521-3.

Vandenbroucke I, Vandesompele J, De Paepe A, Messiaen L. Quantification of NF1 transcripts reveals novel highly expressed splice variants. *FEBS Lett.*2002;522:71-6.

Venneti S, Garimella MT, Sullivan LM, Martinez D, Huse JT, Heguy A, Santi M, Thompson CB, Judkins AR. Evaluation of histone 3 lysine 27 trimethylation (H3K27me3) and enhancer of Zest 2 (EZH2) in pediatric glial and glioneuronal tumors shows decreased H3K27me3 in H3F3A K27M mutant glioblastomas. *Brain Pathol.* 2013;23(5):558-64.

Verdijk RM, den Bakker MA, Dubbink HJ, Hop WC, Dinjens WN, Kros JM. TP53 mutation analysis of malignant peripheral nerve sheath tumors. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2010;69(1):16-26.

Visel A, Zhu Y, May D, Afzal V, Gong E, Attanasio C, Blow MJ, Cohen JC, Rubin EM, Pennacchio LA. Targeted deletion of the 9p21 non-coding coronary artery disease risk interval in mice. *Nature.* 2011;464:409-12.

Visvader JE, Lindeman GJ. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nat Rev Cancer.* 2008;8:755-68.

Vogel KS, Klesse LJ, Velasco-Miguel S, Meyers K, Rushing EJ, Parada LF. Mouse tumor model for neurofibromatosis type 1. *Science*. 1999;286(5447):2176-9.

Voigt P, LeRoy G, Drury WJ 3rd, Zee BM, Son J, Beck DB, Young NL, Garcia BA, Reinberg D. Asymmetrically modified nucleosomes. *Cell.* 2012;151(1):181-93.

Voigt P, Reinberg D. Putting a halt on PRC2 in pediatric glioblastoma. *Nat Genet.* 2013;45(6):587-9.

Walker E, Chang WY, Hunkapiller J, Cagney G, Garcha K, Torchia J, Krogan NJ, Reiter JF, Stanford WL. Polycomb-like 2 associates with PRC2 and regulates transcriptional networks during mouse embryonic stem cell self-renewal and differentiation. *Cell Stem Cell.* 2010;6(2):153-66.

Walker JA, Tchoudakova AV, McKenney PT, Brill S, Wu D, Cowley GS, Hariharan IK, Bernards A. Reduced growth of Drosophila neurofibromatosis 1 mutants reflects a non-cell-autonomous requirement for GTPase-Activating Protein activity in larval neurons. *Genes Dev.* 2006;20(23):3311-23.

Wang A, Papneja A, Hyrcza M, Al-Habeeb A, Ghazarian D. BAP1: gene of the month. *J Clin Pathol.* 2016. [*Epub ahead of print*]

Wang HF, Shih YT, Chen CY, Chao HW, Lee MJ, Hsueh YP. Valosin-containing protein and neurofibromin interact to regulate dendritic spine density. *J Clin Invest.* 2011;121(12):4820-37.

Wang S, He F, Xiong W, Gu S, Liu H, Zhang T, Yu X, and Chen Y. Polycomblike-2-deficient mice exhibit normal left-right asymmetry. *Dev. Dyn.* 2007;236(3):853-61.

Wang X, Levin AM, Smolinski SE, Vigneau FD, Levin NK, Tainsky MA. Breast cancer and other neoplasms in women with neurofibromatosis type 1: a retrospective review of cases in the Detroit metropolitan area. *Am J Med Genet A*. 2012;158A(12):3061-4.

Warrington NM, Gianino SM, Jackson E, Goldhoff P, Garbow JR, Piwnica-Worms D, Gutmann DH, Rubin JB. Cyclic AMP suppression is sufficient to induce gliomagenesis in a mouse model of neurofibromatosis-1. *Cancer Res.* 2010;70(14):5717-27.

Warrington NM, Woerner BM, Daginakatte GC, Dasgupta B, Perry A, Gutmann DH, Rubin JB. Spatiotemporal differences in CXCL12 expression and cyclic AMP underlie the unique pattern of optic glioma growth in neurofibromatosis type 1. *Cancer Res.* 2007;67(18):8588-95.

Wassef M, Rodilla V, Teissandier A, Zeitouni B, Gruel N, Sadacca B, Irondelle M, Charruel M, Ducos B, Michaud A, *et al*. Impaired PRC2 activity promotes transcriptional instability and favors breast tumorigenesis. *Genes Dev.* 2015;29(24):2547-62

Watson AL, Rahrmann EP, Moriarity BS, Choi K, Conboy CB, Greeley AD, Halfond AL, Anderson LK, Wahl BR, Keng VW, *et al.* Canonical Wnt/β-catenin signaling drives human schwann cell transformation, progression, and tumor maintenance. *Cancer Discov.* 2013;3(6):674-89.

Welti S, Fraterman S, D'Angelo I, Wilm M, Scheffzek K. The sec14 homology module of neurofibromin binds cellular glycerophospholipids: mass spectrometry and structure of a lipid complex. *J Mol Biol.* 2007;366(2):551-62.

Welti S, Kühn S, D'Angelo I, Brügger B, Kaufmann D, Scheffzek K. Structural and biochemical consequences of NF1 associated nontruncating mutations in the Sec14-PH module of neurofibromin. *Hum Mutat.* 2011;32(2):191-7.

Wennerberg K, Rossman KL, Der CJ. The Ras superfamily at a glance. *J Cell Sci.* 2005;118(Pt 5):843-6. Review.

Wexler EM, Paucer A, Kornblum HI, Palmer TD, Geschwind DH. Endogenous Wnt signaling maintains neural progenitor cell potency. *Stem Cells.* 2009;27:1130-41.

Williams JP, Wu J, Johansson G, Rizvi TA, Miller SC, Geiger H, Malik P, Li W, Mukouyama YS, Cancelas JA, Ratner N. Nf1 mutation expands an EGFR-dependent peripheral nerve progenitor that confers neurofibroma tumorigenic potential. *Cell Stem Cell.* 2008;3(6):658-69.

Wolman MA, de Groh ED, McBride SM, Jongens TA, Granato M, Epstein JA. Modulation of cAMP and ras signaling pathways improves distinct behavioral deficits in a zebrafish model of neurofibromatosis type 1. *Cell Rep.* 2014;8(5):1265-70.

Woo CJ, Kharchenko PV, Daheron L, Park PJ, Kingston RE. A region of the human HOXD cluster that confers polycomb-group responsiveness. *Cell*. 2010;140(1):99-110.

Wu G, Broniscer A, McEachron TA, Lu C, Paugh BS, Becksfort J, Qu C, Ding L, Huether R, Parker M, *et al*. Somatic histone H3 alterations in pediatric diffuse intrinsic pontine gliomas and non-brainstem glioblastomas. *Nat Genet*. 2012;44(3):251-3.

Wu G, Diaz AK, Paugh BS, Rankin SL, Ju B, Li Y, Zhu X, Qu C, Chen X, Zhang J, *et al*. The genomic landscape of diffuse intrinsic pontine glioma and pediatric non-brainstem high-grade glioma. *Nat Genet*. 2014;46(5):444-50.

Wu H, Chen X, Xiong J, Li Y, Li H, Ding X, Liu S, Chen S, Gao S, Zhu B. Histone methyltransferase G9a contributes to H3K27 methylation in vivo. *Cell Res.* 2011;21:365-7.

Wu J, Williams JP, Rizvi TA, Kordich JJ, Witte D, Meijer D, Stemmer-Rachamimov AO, Cancelas JA, Ratner N. Plexiform and dermal neurofibromas and pigmentation are caused by Nf1 loss in desert hedgehog-expressing cells. Cancer Cell. 2008;13(2):105-16.

Wu SC, Zhang Y. Cyclin-dependent kinase 1 (CDK1)-mediated phosphorylation of enhancer of zeste 2 (Ezh2) regulates its stability. *J Biol Chem.* 2011;286:28511-9.

Xu C, Bian C, Yang W, Galka M, Ouyang H, Chen C, Qiu W, Liu H, Jones AE, MacKenzie F, Pan P, Li SS, Wang H, Min J. Binding of different histone marks differentially regulates the activity and specificity of polycomb repressive complex 2 (PRC2). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(45):19266-71.

Xu GF, O'Connell P, Viskochil D, Cawthon R, Robertson M, Culver M, Dunn D, Stevens J, Gesteland R, White R, *et al.* The neurofibromatosis type 1 gene encodes a protein related to GAP. *Cell* 1990;62:599-608.

Xu K, Wu ZJ, Groner AC, He HH, Cai C, Lis RT, Wu X, Stack EC, Loda M, Liu T, *et al*. EZH2 oncogenic activity in castration-resistant prostate cancer cells is Polycomb-independent. *Science*. 2012;338(6113):1465-9.

Yang FC, Chen S, Clegg T, Li X, Morgan T, Estwick SA, Yuan J, Khalaf W, Burgin S, Travers J, Parada LF, Ingram DA, Clapp DW. Nf1+/- mast cells induce neurofibroma like phenotypes through secreted TGF-beta signaling. *Hum Mol Genet.* 2006;15(16):2421-37.

Yang FC, Ingram DA, Chen S, Hingtgen CM, Ratner N, Monk KR, Clegg T, White H, Mead L, Wenning MJ, Williams DA, Kapur R, Atkinson SJ, Clapp DW. Neurofibromin-deficient Schwann cells secrete a potent migratory stimulus for Nf1+/- mast cells. *J Clin Invest.* 2003;112(12):1851-61.

Yang FC, Ingram DA, Chen S, Zhu Y, Yuan J, Li X, Yang X, Knowles S, Horn W, Li Y, Zhang S, Yang Y, Vakili ST, Yu M, Burns D, Robertson K, Hutchins G, Parada LF, Clapp DW. Nf1-dependent tumors require a microenvironment containing Nf1+/-- and c-kit-dependent bone marrow. *Cell.* 2008;135(3):437-48.

Yap KL, Li S, Muñoz-Cabello AM, Raguz S, Zeng L, Mujtaba S, Gil J, Walsh MJ, Zhou MM. Molecular interplay of the noncoding RNA ANRIL and methylated histone H3 lysine 27 by polycomb CBX7 in transcriptional silencing of INK4a. *Mol Cell*. 2010;38(5):662-74.

Yuan W, Xu M, Huang C, Liu N, Chen S, Zhu B. H3K36 methylation antagonizes PRC2-mediated H3K27 methylation. *J Biol Chem.* 2011;286:7983-9.

Zechner D, Müller T, Wende H, Walther I, Taketo MM, Crenshaw EB 3rd, Treier M, Birchmeier W, Birchmeier C. Bmp and Wnt/beta-catenin signals control expression of the transcription factor Olig3 and the specification of spinal cord neurons. *Dev Biol.* 2007;303(1):181-90.

Zee BM, Levin RS, Xu B, LeRoy G, Wingreen NS, Garcia BA. In vivo residue-specific histone methylation dynamics. *J Biol Chem.* 2010;285(5):3341-50.

Zhang J, Ding L, Holmfeldt L, Wu G, Heatley SL, Payne-Turner D, Easton J, Chen X, Wang J, Rusch M, et al. The genetic basis of early T-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. *Nature.* 2012;481(7380):157-63.

Zhang M, Wang Y, Jones S, Sausen M, McMahon K, Sharma R, Wang Q, Belzberg AJ, Chaichana K, Gallia GL, *et al*. Somatic mutations of SUZ12 in malignant peripheral nerve sheath tumors. *Nat Genet*. 2014;46(11):1170-2.

Zhao J, Sun BK, Erwin JA, Song JJ, Lee JT. Polycomb proteins targeted by a short repeat RNA to the mouse X chromosome. *Science.* 2008;322(5902):750-6.

Zheng H, Chang L, Patel N, Yang J, Lowe L, Burns DK, Zhu Y. Induction of abnormal proliferation by nonmyelinating schwann cells triggers neurofibroma formation. *Cancer Cell.* 2008;13(2):117-28.

Zhou L, An N, Haydon RC, Zhou Q, Cheng H, Peng Y, Jiang W, Luu HH, Vanichakarn P, Szatkowski JP, Park JY, *et al*. Tyrosine kinase inhibitor STI-571/Gleevec down-regulates the beta-catenin signaling activity. *Cancer Lett.* 2003;193(2):161-70.

Zhu Y, Ghosh P, Charnay P, Burns DK, Parada LF. Neurofibromas in NF1: Schwann cell origin and role of tumor environment. *Science.* 2002;296:920-2.

ANNEXES

ANNEXE 1

Épigénétique

DOSSIER THÉMATIQUE

Les multiples facettes de PRC2 dans les cancers

The multiple facets of PRC2 in cancer

Armelle Luscan*, Michel Wassef*, Raphaël Margueron*

» Les études de séquençage des cancers menées ces dernières années suggèrent que les facteurs de régulation de la chromatine pourraient jouer un rôle important dans la progression tumorale. Dans cette revue sont explorées les altérations connues de PRC2 *(Polycomb Repressive Complex 2)* dans différents types de cancers. Dans certains lymphomes non hodgkiniens, des mutations ponctuelles d'EZH2, codant la sous-unité catalytique du complexe, semblent conférer un gain de fonction. En conséquence, des inhibiteurs spécifiques de l'activité enzymatique de PRC2 sont actuellement à l'essai chez l'homme. Toutefois, des mutations inactivant partiellement ou totalement l'activité de PRC2 ont également été retrouvées dans plusieurs autres types de cancers. Ces observations appellent à des études destinées à mieux comprendre les altérations de PRC2 et leurs conséquences fonctionnelles.

Mots-clés : Polycomb – Cancer – Transcription – Chromatine.

summary

Systematic sequencing of cancer genomes suggest that factors involved in chromatin regulation could play a key role in tumour progression. In this review, we explore known alterations of the PRC2 complex in different types of cancers. In certain types of non-Hodgkin lymphomas, point mutations in EZH2, encoding the catalytic subunit of the complex, seem to confer a gain of function. As a result, specific inhibitors of PRC2's catalytic activity are currently in clinical trials. Yet, partial or complete loss of function mutations have also been found in several other types of cancers. These observations call for studies aiming at better understanding PRC2 alterations and their functional consequences.

***Keywords:* Polycomb – Cancer – Transcription – Chromatin.**

Ces dernières années ont mis en lumière le rôle majeur des processus épigénétiques dans l'établissement et le maintien des états d'expression des gènes ainsi que dans l'identité cellulaire *(1)*. La chromatine, qui consiste en l'association de l'ADN avec les protéines histones, est sujette à des modifications dynamiques jouant un rôle fondamental dans la régulation de l'accessibilité de l'ADN et donc dans l'établissement, le maintien et la propagation des profils d'expression des gènes. Cette régulation s'effectue à différents niveaux : échange de variants d'histone, remodelage des nucléosomes par des complexes de remodelage dépendant des ATP, ainsi que modifications covalentes de l'ADN et des histones *(2)*.

L'émergence des technologies haut débit de nouvelle génération a permis la mise en évidence de mutations somatiques fréquentes au sein de nombreux gènes participant à l'organisation de l'épigénome dans de multiples types de cancers. Ainsi, des mutations de gènes codant des acteurs de la méthylation de l'ADN, du remodelage des nucléosomes, des modifications d'histones, voire des mutations des histones elles-mêmes, ont été identifiées, suggérant que la dérégulation de la structure chromatinienne est un thème récurrent du développement tumoral. Dans cette revue, nous proposons d'explorer les différentes facettes de l'implication d'un complexe clé de modification post-traductionnelle d'histones, PRC2 *(Polycomb Repressive Complex 2)*, dans la tumorigenèse ***(figure 1)***.

PRC2 est composé de 4 sous-unités protéiques principales qui forment le module de base pour l'activité enzymatique de ce complexe : EZH1/EZH2 *(Enhancer of Zeste Homolog 1/2)*, SUZ12 *(Suppressor of Zeste 12)*, EED *(Embryonic Ectoderm Development)*, et RBBP4/7 *(RetinoBlastoma-Binding Protein 7)*, également appelée RbAp46/48. EZH2, portant la fonction catalytique, SUZ12 et EED sont propres à ce complexe, alors que RBBP4/7 sont retrouvées en association avec d'autres protéines. Des cofacteurs s'associent à ce module de base pour réguler son activité et favoriser son recrutement sur ses gènes cibles *(3)*. Au niveau de ces gènes, PRC2 catalyse successivement la mono-, la di- et la triméthylation de

** Unité de génétique et de biologie du développement UMR3215/U934, Paris.*

la lysine 27 de l'histone H3 (H3K27me1/2/3). La forme triméthylée est spécifiquement localisée au niveau de gènes transcriptionnellement inactifs. Diverses études menées d'abord chez la mouche drosophile puis chez les mammifères ont montré que, si PRC2 est bien un répresseur transcriptionnel, son rôle n'est pas d'établir l'état silencieux mais plutôt de le maintenir *(4, 5)*. Ainsi, PRC2 n'est pas un élément conducteur d'une identité cellulaire particulière, mais un gardien de cette identité ; il n'est donc pas toujours évident de déterminer quelles seront les conséquences fonctionnelles des altérations de PRC2.

Expression élevée d'EZH2 dans les carcinomes

De nombreuses études ont montré qu'EZH2 était présente à des niveaux d'expression très élevés dans différents types de carcinome, dont ceux de la prostate et du sein *(6)*. Dans plusieurs types de carcinome, de forts niveaux d'expression d'EZH2 sont associés à un mauvais pronostic. Plusieurs études suggèrent que l'expression aberrante d'EZH2 dans les carcinomes maintient la répression de loci suppresseurs de tumeurs et notamment du locus *INK4A/ARF* ***(figure 2, p. 18)*** *[7]*. Cependant, l'augmentation du niveau d'EZH2 dans les tumeurs ne se traduit pas nécessairement par une augmentation globale du niveau de H3K27me3, ce qui a conduit plusieurs auteurs à suggérer qu'EZH2 pourrait avoir une action indépendante de celle de PRC2 *(8)*. De surcroît, bien qu'une étude ait initialement observé des amplifications et gains du locus *EZH2 (9)*, les analyses systématiques à l'échelle du génome du nombre de copies n'ont pas permis de corroborer ces résultats. Il semblerait plutôt que l'expression élevée d'EZH2 dans les cancers soit au moins en partie la conséquence d'une prolifération cellulaire accrue *(Wassef et al., article en préparation)*. En tout état de cause, une validation génétique dans des modèles de souris et/ou des xénogreffes de lignées humaines génétiquement modifiées est nécessaire afin de clarifier la contribution d'EZH2 à la progression tumorale.

Mutations gain de fonction d'EZH2 dans les lymphomes

La situation dans certains types de lymphome est différente puisque des données génétiques et biochimiques suggèrent qu'EZH2 pourrait agir comme un oncogène. Plusieurs études de séquençage d'exome ont en effet

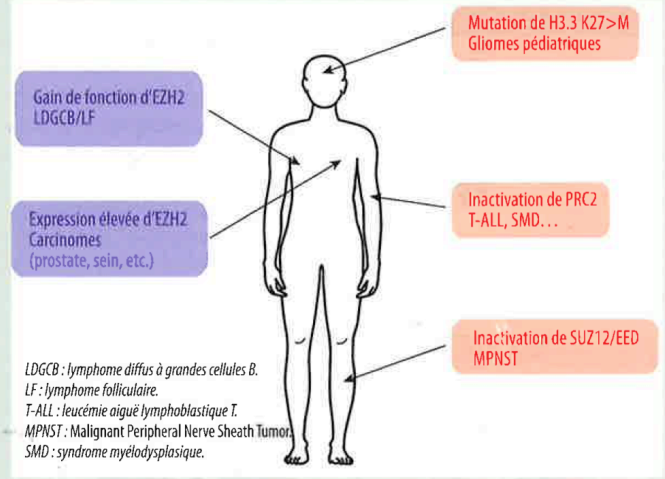
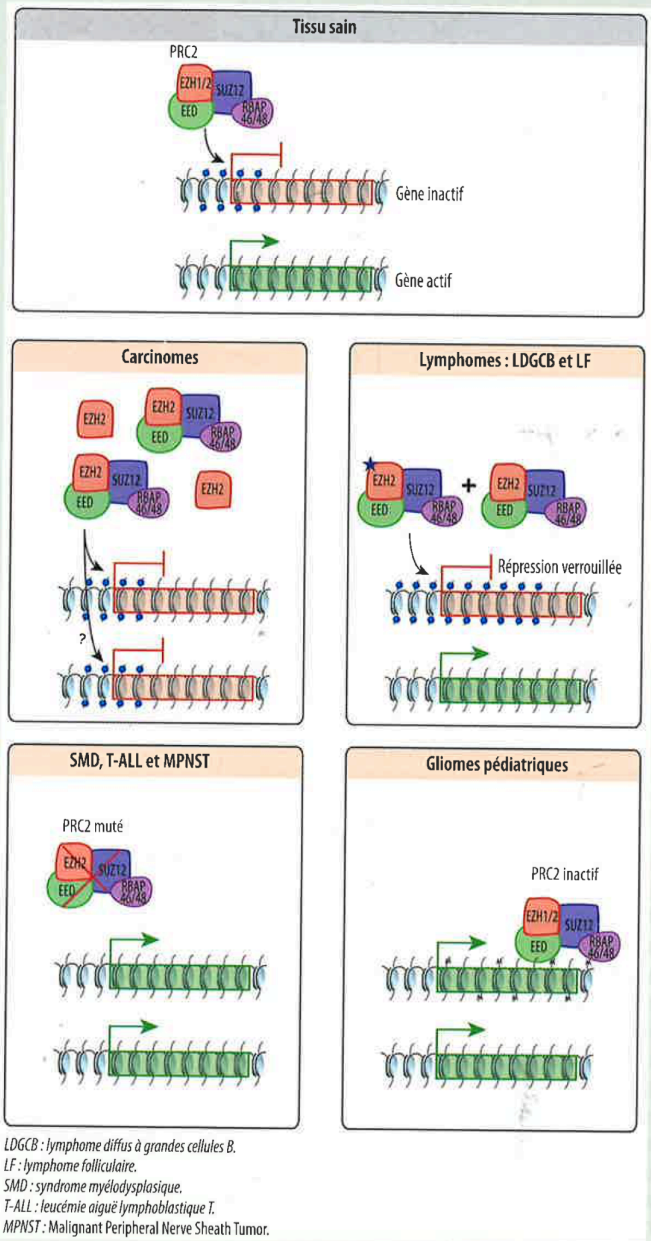


Figure 1. Les altérations de PRC2/H3K27me3 dans différents types de cancer.

conduit à l'identification de mutations ponctuelles récurrentes du gène *EZH2* dans 22 % des lymphomes diffus à grandes cellules B de type centrogerminatif et dans 7 % des lymphomes folliculaires *(10)*. Ces mutations conduisent à des substitutions d'acides aminés du domaine catalytique de l'enzyme, le plus fréquemment affecté étant le résidu Y641. Bien que cette mutation ait été initialement rapportée comme étant à l'origine d'une perte de fonction *(10)*, plusieurs travaux ultérieurs menés in vitro ont montré que l'altération résultante conduit à une augmentation de l'activité catalytique de l'enzyme de la monométhylation vers la di- et la triméthylation (me1>me2 et me2>me3). Cette mutation induit ainsi l'accumulation de H3K27me3 à des niveaux anormalement élevés, aux dépens de me2 et, dans une moindre mesure, de me1 *(11, 12)*. L'activité me0>me1 de l'enzyme mutante, pourtant indispensable à la di- et la triméthylation, est, quant à elle, presque absente. Par conséquent, l'enzyme mutante n'est capable d'agir qu'en présence de l'enzyme normale, ce qui constitue un exemple unique de partage des tâches entre activités enzymatiques normale et pathologique. Une fonction oncogénique du couple EZH2 sauvage/mutant est de plus confortée par des modèles murins de surexpression de la forme mutée dans les cellules B du centre germinatif qui donne lieu à une accélération de la transformation tumorale *(13)*. Pourquoi une telle altération d'EZH2 est-elle sélectionnée dans les lymphomes ? Quelles en sont les conséquences précises en termes de régulation transcriptionnelle des cibles de PRC2 et en quoi



LDGCB : lymphome diffus à grandes cellules B.
LF : lymphome folliculaire.
SMD : syndrome myélodysplasique.
T-ALL : leucémie aiguë lymphoblastique T.
MPNST : Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumor.

Figure 2. Conséquences connues ou supposées des altérations de PRC2 sur la répression transcriptionnelle.

cela favorise-t-il la progression tumorale ? L'étude de W. Béguelin et al. suggère que l'accumulation excessive de H3K27me3 au niveau de gènes de différenciation pourrait inhiber la différenciation terminale des cellules B des centres germinatifs en plasmocytes et en cellules mémoires ***(figure 2)*** *[13]*. Bien que plusieurs questions essentielles restent en suspens, le développement récent d'inhibiteurs spécifiques d'EZH2 offre une opportunité thérapeutique nouvelle pour ces lymphomes. In vitro comme in vivo, ces inhibiteurs inhibent sélectivement la multiplication des cellules de lymphome porteuses de la mutation gain de fonction *(12-15)*. Deux de ces inhibiteurs, les composés E7438 et GSK2816126, sont actuellement en essai clinique chez des patients atteints de lymphome diffus à grandes cellules B et/ou de lymphome folliculaire. Par ailleurs, il semblerait que certaines altérations génétiques sensibilisent plusieurs autres types de tumeur à l'action d'inhibiteurs d'EZH2. Leur application en cancérologie est donc susceptible de dépasser le cadre des lymphomes.

Mutations d'*EZH2*, de *SUZ12* ou d'*EED* dans les autres hémopathies

Dans des hémopathies myéloïdes, des mutations somatiques "perte de fonction" des gènes *EZH2*, *SUZ12* et *EED* ont été identifiées *(16-18)*. *EZH2* est le gène majoritairement retrouvé muté (8 % versus 3,3 % pour *SUZ12/EED*). En plus des cas de mutation directe du gène, l'expression d'*EZH2* est aussi diminuée chez plus de la moitié des patients porteurs de mutations affectant les gènes du splicéosome comme *U2AF1/SRSF2 (18)*. Quel que soit le gène muté, le résultat est une altération de l'activité enzymatique de PRC2, la perte de la marque H3K27me3 et, en conséquence, la dérépression potentielle des gènes cibles de PRC2 ***(figure 2)***. La présence d'une mutation somatique d'*EZH2* est un facteur prédictif de mauvais pronostic en termes de survie globale dans les syndromes myélodysplasiques, pourtant sans augmentation du risque de transformation en leucémie aiguë myéloïde *(19, 20)*. Ces données suggèrent un rôle différent de PRC2 dans les hémopathies myéloïdes chroniques et aiguës, d'autant que seules de très rares mutations d'*EZH2* ont été observées dans des leucémies aiguës myéloïdes. La perte de fonction d'Ezh2 seule ou en association avec Runx1 ou Tet2 suffit à la survenue de syndromes myélodysplasiques et de syndromes myéloprolifératifs chez la souris, suggérant cette fois une fonction "suppresseur de tumeur" d'EZH2 dans les hémopathies myéloïdes *(20, 21)*.

En outre, la présence de mutations "perte de fonction" et de délétions des gènes *EZH2*, *SUZ12* et *EED* a été mise en évidence dans des leucémies aiguës lymphoblastiques T *(22, 23)*. Là encore, *EZH2* est le gène majoritairement

muté. L'inactivation de PRC2 a été montrée comme étant impliquée dans la transformation des cellules leucémiques, notamment via son interaction fonctionnelle avec NOTCH1. L'inactivation d'*Ezh2* dans les cellules souches hématopoïétiques est suffisante pour induire une leucémie aiguë T agressive chez la souris, suggérant un rôle causal de la dérégulation d'EZH2 dans la leucémogenèse T *(24)*.

Mutations de *SUZ12* et d'*EED* dans les MPNST

Les MPNST *(Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumor)*, ou neurofibrosarcomes, sont des tumeurs malignes des gaines des nerfs périphériques, très agressives, à haut potentiel métastatique. La moitié des MPNST surviennent chez des patients atteints de neurofibromatose de type 1, syndrome génétique à transmission autosomique dominante, caractérisé par la présence d'une mutation germinale hétérozygote du gène suppresseur de tumeurs *NF1 (Neurofibromin 1)*. Dans ce cas, les MPNST se développent à partir de tumeurs nerveuses bénignes préexistantes appelées "neurofibromes plexiformes". Les autres MPNST surviennent de façon sporadique ou à la suite d'une radiothérapie. Quel que soit leur contexte de survenue, la perte de fonction du gène *NF1* est une caractéristique génétique commune aux MPNST. Cependant, l'inactivation de *NF1* est également présente dans les neurofibromes et ne suffit pas à expliquer la transformation maligne en MPNST. Récemment, il a été montré que plus de 70 % des MPNST présentent des mutations "perte de fonction" des gènes *SUZ12* ou *EED*, environ 2/3 d'entre elles étant homozygotes *(25-27)*. Les tumeurs dans lesquelles les gènes *SUZ12* ou *EED* sont inactivés perdent la marque H3K27me3 et ont un profil transcriptionnel distinct. La "perte de fonction" de *SUZ12* ou *EED* est spécifique des MPNST puisqu'elle n'est pas identifiée dans les neurofibromes. De plus, l'inactivation concomitante de *Nf1* et *Suz12* dans un modèle murin conduit au développement de MPNST, indiquant un rôle majeur de PRC2 dans cette pathologie.

Mutations de la lysine 27 (K27) dans les gliomes pédiatriques de haut grade

Très récemment, il a été montré que des altérations génétiques ciblent également les histones sur des résidus soit directement sujets à des modifications post-traductionnelles soit dont la mutation pouvait affecter des modifications avoisinantes. Ainsi, des mutations récurrentes remplaçant la lysine 27 par une méthionine (K27M) au sein de différents variants de l'histone H3 ont été identifiées dans les gliomes *(28-30)*. Ces mutations sont présentes à des taux très élevés dans certains gliomes pédiatriques de haut grade : par exemple, environ 80 % des gliomes infiltrants du tronc cérébral présentent une mutation K27M. La substitution K27M survient exclusivement dans 3 des 16 gènes d'histone H3 : le gène *H3F3A* codant le variant H3.3 et les gènes *HIST1H3B* et *HIST1H3C* codant le variant H3.1. De façon surprenante, aucune altération génétique n'a été identifiée au sein de gènes codant les protéines responsables de modifications post-traductionnelles de K27. Pourtant, des mutations affectant des modificateurs de toutes les autres lysines de l'extrémité N-terminale de l'histone H3 (K4, K9, K18 ou K36) ont été décrites dans ces tumeurs *(30)*. Les mutations hétérozygotes K27M d'H3.3 et H3.1, alors même qu'elles n'affectent qu'une minorité du pool d'histone H3, ont un effet dominant négatif et conduisent à une diminution globale d'H3K27me3 et à une dérépression des gènes cibles de PRC2 ***(figure 2)*** *[31-33]*. La mutation H3K27M définit un sous-groupe de gliomes de haut grade distincts cliniquement, avec une signature transcriptionnelle, des caractéristiques génétiques et un profil de méthylation particuliers *(34, 35)*. Des approches thérapeutiques ont été proposées sur la base de cette mutation *(36, 37)* ; toutefois, leur pertinence reste à confirmer.

Spécificité des mutations PRC2 dans chaque type tumoral

Décrits tantôt comme oncogènes, tantôt comme suppresseurs de tumeurs, les gènes de PRC2 ont, selon le contexte cellulaire, un spectre de mutations bien différent.

De plus, même au sein des tumeurs ayant une perte de fonction de PRC2, avec comme conséquence commune la perte de la triméthylation d'H3K27 et une dérépression des gènes cibles de PRC2, la nature des gènes altérés peut être complètement différente. Ainsi, à ce jour, aucune altération d'*EZH2* n'est identifiée dans les MPNST ; de même, la mutation K27M semble être spécifique des gliomes de haut grade, alors qu'aucune mutation d'*EZH2*, *SUZ12* ou *EED* n'y est retrouvée… Ces constatations suggèrent que les conséquences de chacune de ces mutations ne sont pas équivalentes, notamment sur les niveaux globaux d'H3K27me2/3. L'étude en détail des différences fonctionnelles de chaque type de mutation est nécessaire pour mieux comprendre, à l'avenir, leurs rôles respectifs.

PRC2, un régulateur transcriptionnel pas comme les autres

Comme nous l'avons indiqué en introduction, les propriétés particulières de la répression par les protéines Polycomb compliquent l'analyse de leur contribution à la tumorigenèse. Le recrutement secondaire de PRC2 à la suite de l'arrêt de la transcription explique qu'une grande majorité des cibles du complexe soit insensible à son altération, au moins à l'échelle d'une population cellulaire. Comment, dès lors, expliquer l'impact de la perte de PRC2 sur le développement des hémopathies, des MPNST et des glioblastomes pédiatriques ? L'impact de l'altération de PRC2 est-il le résultat direct de l'activation d'une petite cohorte de gènes ou de la perte d'une couche de régulation au niveau de plusieurs milliers d'autres gènes ?

La plupart des études actuelles s'intéressent essentiellement à la première composante, plus visible. Il est proposé que, selon le tissu touché, le résultat de l'activation de gènes "prêts à être activés" pourrait a priori induire soit un changement de l'état de différenciation – une partie importante des cibles de PRC2 codant des facteurs de spécification de l'identité cellulaire –, soit une agressivité accrue des cellules cancéreuses (prolifération, migration, etc.) si la balance des gènes pro- et antitumorigéniques penche en faveur d'une action protumorigénique. Cependant, la nature des cibles diverge grandement d'un tissu à l'autre et les études diffèrent quant aux cibles candidates si bien que, à l'heure actuelle, aucune preuve définitive ne permet d'établir que la dérégulation d'une cohorte de gènes définis sous-tend l'implication de PRC2 comme régulateur de la tumorigenèse.

On peut en outre imaginer que la perte d'une couche de régulation au niveau de plusieurs milliers de gènes puisse avoir un impact important pour la progression tumorale. Il sera notamment intéressant d'évaluer la réponse de ces gènes "silencieux" à un stimulus ou bien d'apprécier s'ils sont activés de manière stochastique dans une fraction de cellule. Une telle activation sporadique serait susceptible de favoriser l'hétérogénéité cellulaire et donc d'accélérer l'évolution tumorale.

Conclusion

Les connaissances actuelles sur les altérations de PRC2 dans les cancers illustrent la diversité mais également la spécificité des dérégulations de la machinerie Polycomb. D'autres niveaux de régulation que nous n'avons pas explorés ici (ARN non codants, déméthylases, etc.) sont susceptibles d'enrichir ce tableau. Un défi majeur sera de développer des thérapies permettant de cibler ces altérations, soit directement, comme dans le cas des lymphomes (gain de fonction), soit indirectement, en identifiant des sensibilités accrues à des thérapies consécutives à l'altération de la machinerie Polycomb. Ces études illustrent de façon plus large la liaison étroite entre la régulation de la structure de la chromatine et le développement des cancers. ■

Les auteurs déclarent ne pas avoir de liens d'intérêts.

Références

1. *Rajasekhar VK, Begemann M. Concise review: roles of polycomb group proteins in development and disease: a stem cell perspective. Stem Cells 2007;25(10):2498-510 [Review].*

2. *Laugesen A, Helin K. Chromatin repressive complexes in stem cells, development, and cancer. Cell Stem Cell 2014;14(6):735-51.*

3. *Margueron R, Reinberg D. The Polycomb complex PRC2 and its mark in life. Nature 2011;469(7330):343-9 [Review].*

4. *Struhl G, Akam M. Altered distributions of Ultrabithorax transcripts in extra sex combs mutant embryos of Drosophila. EMBO J 1985;4(12):3259-64.*

5. *Riising EM, Comet I, Leblanc B, Wu X, Johansen JV, Helin K. Gene silencing triggers polycomb repressive complex 2 recruitment to CpG islands genome wide. Mol Cell 2014;55(3):347-60.*

6. *Chase A, Cross NC. Aberrations of EZH2 in cancer. Clin Cancer Res 2011;17(9):2613-8 [Review].*

7. *Bracken AP, Kleine-Kohlbrecher D, Dietrich N et al. The Polycomb group proteins bind throughout the INK4A-ARF locus and are disassociated in senescent cells. Genes Dev 2007;21(5):525-30.*

8. *Xu K, Wu ZJ, Groner AC et al. EZH2 oncogenic activity in castration-resistant prostate cancer cells is Polycomb-independent. Science 2012;338(6113):1465-9.*

9. *Bracken AP, Pasini D, Capra M, Prosperini E, Colli E, Helin K. EZH2 is downstream of the pRB-E2F pathway, essential for proliferation and amplified in cancer. EMBO J 2003;22(20):5323-35.*

10. *Morin RD, Johnson NA, Severson TM et al. Somatic mutations altering EZH2 (Tyr641) in follicular and diffuse large B-cell lymphomas of germinal-center origin. Nat Genet 2010;42(2):181-5.*

11. *Sneeringer CJ, Scott MP, Kuntz KW, Knutson SK, Pollock RM, Richon VM, Copeland RA. Coordinated activities of wild-type plus mutant EZH2 drive tumor-associated hypertrimethylation of lysine 27 on histone H3 (H3K27) in human B-cell lymphomas. Proc Natl Acad Sci USA 2010;107(49):20980-5.*

12. *McCabe MT, Ott HM, Ganji G et al. EZH2 inhibition as a therapeutic strategy for lymphoma with EZH2-activating mutations. Nature 2012;492(7427):108-12.*

13. *Béguelin W, Popovic R, Teater M et al. EZH2 is required for germinal center formation and somatic EZH2 mutations promote lymphoid transformation. Cancer Cell 2013;23(5):677-92.*

14. *Knutson SK, Wigle TJ, Warholic NM et al. A selective inhibitor of EZH2 blocks H3K27 methylation and kills mutant lymphoma cells. Nat Chem Biol 2012;8(11):890-6.*

15. *Garapaty-Rao S, Nasveschuk C, Gagnon A et al. Identification of EZH2 and EZH1 small molecule inhibitors with selective impact on diffuse large B cell lymphoma cell growth. Chem Biol 2013;20(11):1329-39.*

16. *Ernst T, Chase AJ, Score J et al. Inactivating mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myeloid disorders. Nat Genet 2010;42(8):722-6.*

17. *Nikoloski G, Langemeijer SM, Kuiper RP et al. Somatic mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myelodysplastic syndromes. Nat Genet 2010;42(8):665-7.*

18. *Khan SN, Jankowska AM, Mahfouz R et al. Multiple mechanisms deregulate EZH2 and histone H3 lysine 27 epigenetic changes in myeloid malignancies. Leukemia 2013;27(6):1301-9.*

19. *Bejar R, Stevenson K, Abdel-Wahab O et al. Clinical effect of point mutations in myelodysplastic syndromes. N Engl J Med 2011;364(26):2496-506.*

20. *Sashida G, Harada H, Matsui H et al. Ezh2 loss promotes development of myelodysplastic syndrome but attenuates its predisposition to leukaemic transformation. Nat Commun 2014;5:4177.*

21. *Muto T, Sashida G, Oshima M et al. Concurrent loss of Ezh2 and Tet2 cooperates in the pathogenesis of myelodysplastic disorders. J Exp Med 2013;210(12):2627-39.*

22. *Ntziachristos P, Tsirigos A, Van Vlierberghe P et al. Genetic inactivation of the polycomb repressive complex 2 in T cell acute lymphoblastic leukemia. Nat Med 2012;18(2):298-301.*

@ Retrouvez l'intégralité des références bibliographiques sur www.edimark.fr

ANNEXE 2

NOUVELLE

Altérations du PRC2 au sein des tumeurs malignes associées à la neurofibromatose de type 1 : des cellules de Schwann sans aucun complexe !

Armelle Luscan[1,2], Dominique Vidaud[1,2], Nicolas Ortonne[3], Pierre Wolkenstein[4], Michel Vidaud[1,2], Éric Pasmant[1,2]

[1] Service de biochimie et de génétique moléculaire, hôpital Cochin, AP-HP, Paris, France ;
[2] Inserm EA7331, université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, faculté des sciences pharmaceutiques et biologiques, 4, avenue de l'Observatoire, 75005 Paris, France ;
[3] département de pathologie et université Paris Est Créteil (UPEC), hôpital Henri Mondor, Créteil, France ;
[4] département de dermatologie, centre de référence des neurofibromatoses, hôpital Henri Mondor, AP-HP, EA 4393 LIC, université Paris Est Créteil (UPEC), Créteil, France.
eric.pasmant@gmail.com
armelleluscan@gmail.com

Les Rasopathies

La voie de transduction intracellulaire des RAS-MAPK (*mitogen-activated protein kinases*) est une des voies le plus communément dérégulée en cancérologie [1]. Des mutations somatiques affectant cette voie de signalisation ont été décrites dans environ 30 % des cancers humains. Dans les années 1990, la découverte de mutations constitutionnelles du gène *NF1* (*neurofibromin 1*) codant une protéine inhibitrice des protéines RAS, a montré pour la première fois que des dérégulations de cette voie de signalisation pouvaient aussi être à l'origine de maladies héréditaires du développement. Depuis, un ensemble de maladies héréditaires causées par des mutations constitutionnelles des acteurs de la voie RAS-MAPK ont été regroupées sous le nom de Rasopathies [2]. Ces maladies partagent des caractéristiques phénotypiques incluant, pour la majorité d'entre elles, une prédisposition tumorale.

La neurofibromatose de type 1

La neurofibromatose de type 1 ou NF1 (MIM#162200) est une Rasopathie causée par des mutations perte de fonction du gène suppresseur de tumeurs *NF1*. Plus de 90 % des patients portent une mutation restreinte au gène *NF1* et une importante variété de ces mutations perte de fonction ont été décrites [3]. Environ 10 % des patients portent une grande délétion récurrente de plus de 1 Mb incluant l'ensemble du gène *NF1* ainsi que 13 gènes adjacents [4]. Ces délétions récurrentes du locus *NF1* sont causées par des recombinaisons homologues non alléliques impliquant des séquences répétées paralogues situées de part et d'autre du gène *NF1*.

Vingt mille individus sont atteints de neurofibromatose de type 1 en France. Cette maladie est caractérisée par la présence de tumeurs bénignes des gaines nerveuses dénommées neurofibromes. Les neurofibromes sont constitués d'une prolifération de cellules de Schwann présentant une inactivation somatique du second allèle *NF1*. Certains des neurofibromes peuvent se transformer – si des événements génétiques additionnels surviennent – en tumeurs malignes des gaines nerveuses dénommées MPNST (*malignant peripheral nerve sheath tumor*). Ces MPNST représentent la première cause de mortalité des patients atteints de NF1.

Du génotype au phénotype : les grandes délétions du locus prédisposent aux MPNST

La NF1, comme d'autres maladies héréditaires de transmission dominante, est caractérisée par une expressivité clinique très variable. Dans le but d'identifier les facteurs génétiques contrôlant l'expression phénotypique de la maladie, une vaste banque de données génotype-phénotype consacrée à la NF1 a été constituée à l'échelle de la France (centre de référence maladies rares des neurofibromatoses, Pr Pierre Wolkenstein).

Chez les patients présentant des mutations restreintes au gène *NF1*, l'étude des corrélations phénotypiques au sein de 275 familles multiplex atteintes de NF1 a permis de montrer l'absence d'influence du type de mutation constitutionnelle sur la variabilité phénotypique [5]. La sévérité de la maladie ne peut pas être prédite par la nature ou la localisation de la mutation dans le gène *NF1*. Cependant, une étude d'association ciblée sur des données familiales (*family-based association study, FBAT*) a permis la première identification d'un modificateur génétique du développement des neurofibromes : le grand ARN non codant *ANRIL* (*antisense non-coding RNA in the INK4 locus*), localisé en 9p21 [6, 11] (➔).

(➔) Voir la Nouvelle de E. Pasmant et al., m/s 2010, n° 6-7, page 564

Pour les patients porteurs de délétions récurrentes de l'ensemble du locus *NF1*, nous avons confirmé l'existence d'un phénotype plus sévère que celui causé par les mutations restreintes au gène *NF1*, avec notamment une susceptibilité accrue aux MPNST [4]. Cette observation suggérait donc l'existence d'un autre gène suppresseur de tumeur – outre *NF1* – parmi les 13 gènes situés dans l'intervalle de délétion récurrente.

Locus *NF1* : un suppresseur de tumeurs peut en cacher un autre

Des données récentes faisaient du gène *SUZ12* (*suppressor of zeste 12 homolog*) un excellent candidat parmi ces 13 gènes.

m/s n° 8-9, vol. 30, août-septembre 2014
DOI : 10.1051/medsci/20143008006

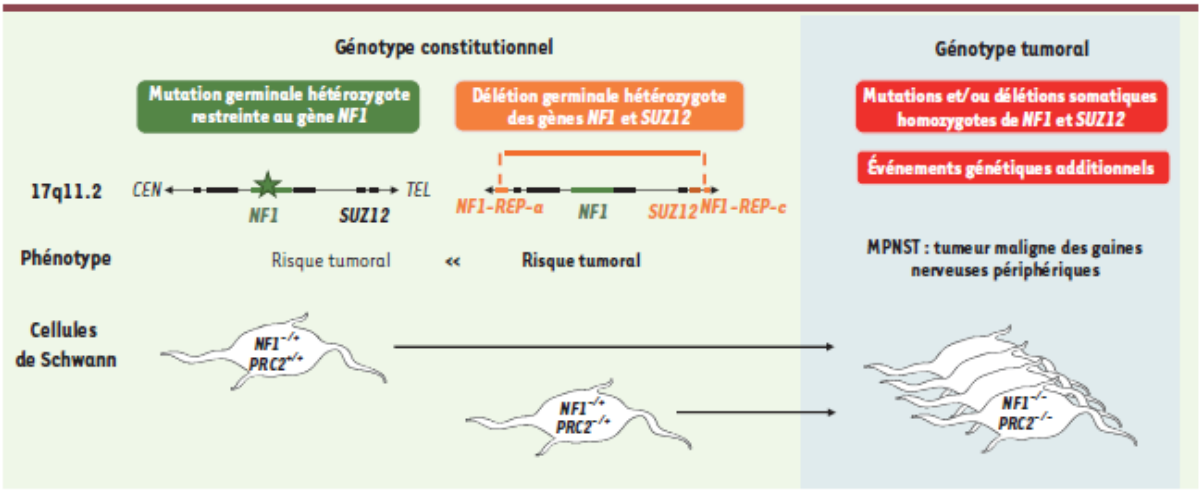


Figure 1. ***Les pertes de fonction de NF1 et SUZ12 coopèrent dans la tumorigenèse des MPNST associés à la NF1.*** Environ 10 % des patients présentent de grandes délétions récurrentes de plus de 1 Mb incluant l'ensemble du gène *NF1* ainsi que 13 gènes additionnels dont le gène *SUZ12*. Ces grandes délétions constitutionnelles du locus *NF1* sont associées à un risque important de survenue de tumeurs malignes des gaines nerveuses. Dans les MPNST, une inactivation du second allèle sauvage du gène *NF1* est observée. Une altération bi-allélique du gène *SUZ12* est également retrouvée dans la majorité de ces tumeurs.

SUZ12 code une protéine majeure du complexe du groupe Polycomb 2 (*polycomb repressive complex 2*, PRC2). Ce complexe protéique est impliqué dans le remodelage de la chromatine parce qu'il induit une modification post-traductionnelle des histones. Le complexe PRC2 catalyse la triméthylation de la lysine 27 de l'histone H3. La modification épigénétique H3K27me3 est une marque chromatinienne associée à une répression transcriptionnelle [7]. De plus, l'interaction entre ANRIL et SUZ12 a été démontrée comme nécessaire à la répression transcriptionnelle épigénétique de certains gènes cibles.

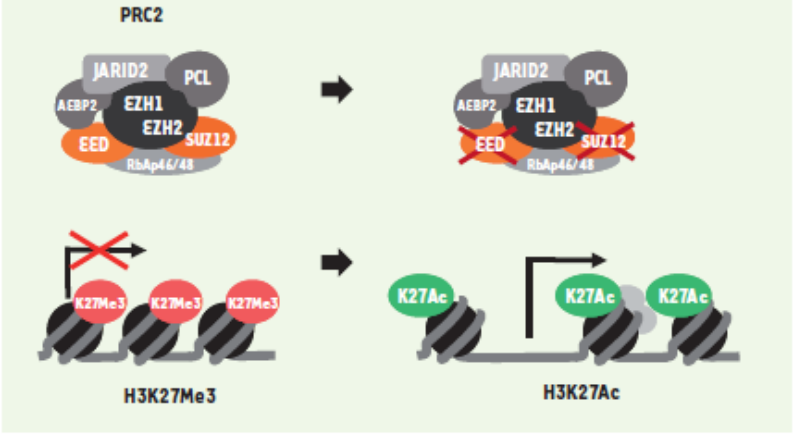


Figure 2. ***Perte de fonction du PRC2.*** Les altérations de SUZ12 et d'EED mises en évidence dans les MPNST conduisent au remplacement de la marque chromatinienne H3K27me3 (méthylation de la lysine 27 de l'histone 3) par H3K27Ac (acétylation de la lysine 27 de l'histone 3). La marque H3K27me3 est généralement observée associée à une chromatine réprimée sur le plan transcriptionnel, alors que la marque H3K27Ac est associée à une chromatine active (d'après Margueron et Reinberg [7]).

De manière intéressante, des mutations perte de fonction de composants du PRC2 ont été identifiées dans plusieurs types d'hémopathies malignes [8]. Des mutations tronquantes de la protéine EZH2 (*enhancer of zeste homolog 2*) portant l'activité catalytique méthyltransférase du PRC2, ainsi que des mutations de *SUZ12*, ont été décrites.

Des cellules de Schwann sans aucun complexe

L'étude ciblée par séquençage nouvelle génération (NGS, *next generation sequencing* ; plate-forme de NGS de l'hôpital Cochin, Paris) de 13 gènes impliqués dans l'établissement de la marque H3K27me3 (dont *SUZ12*) a été menée pour un panel de 51 MPNST, constitué dans le cadre d'une collaboration internationale [9]. Une étude pangénomique par CGH (*comparative genomic hybridization*)-*array* a également été réalisée. Ces approches génomiques ont permis de mettre en évidence une inactivation totale du gène *SUZ12*, ou plus rarement du gène *EED* (*embryonic ectoderm development*), dans plus de la moitié des MPNST. La protéine EED, comme SUZ12, fait partie du complexe

minimal PRC2. La perte de la marque épigénétique H3K27me3 a été confirmée par l'étude immunohistochimique de coupes des tumeurs MPNST mutées. Pour la première fois, l'implication majeure du PRC2 était montrée dans la tumorigenèse associée à la NF1 *(Figure 1)*.

Les chaises musicales : H3K27Ac remplace H3K27me3

Un modèle murin de double invalidation hétérozygote en *cis* $Nf1^{+/-}$;$Suz12^{+/-}$ a permis de confirmer l'importance de la coopération entre les altérations de *NF1* et de *SUZ12* dans la tumorigenèse des MPNST [9]. L'inactivation du PRC2 entraîne la perte de la marque chromatinienne H3K27me3 au sein des tumeurs. Une acétylation de la même lysine est également observée en lieu et place de la méthylation manquante *(Figure 2)*. La marque épigénétique H3K27Ac est en général retrouvée associée à une chromatine active sur le plan transcriptionnel. Cette acétylation conduit au recrutement de protéines à bromodomaines, lectrices de la marque H3K27Ac et associées à des facteurs de transcription. L'analyse des données de transcriptome et d'immunoprécipitation de la chromatine couplée au NGS (*chromatin immunoprecipitation ChIP-sequencing*) acquises dans les tumeurs mutées a permis de proposer des cibles transcriptionnelles de ces modifications chromatiniennes. Les altérations du PRC2 permettraient notamment une amplification de la signature transcriptionnelle associée à l'activation de la voie RAS-MAPK.

H3K27me3 et H3K27Ac : biomarqueurs de mutation, voire de sensibilité thérapeutique

Des inhibiteurs de la lecture de la marque H3K27Ac récemment développés ont montré leur efficacité antitumorale *in vivo* dans le modèle murin préclinique transgénique $Nf1^{+/-}$;$Suz12^{+/-}$ en association à une thérapie ciblée de la voie RAS-MAPK (anti-MEK) [9]. Ces inhibiteurs de bromodomaines [10] représentent donc une stratégie thérapeutique prometteuse pour les MPNST associées à la NF1, qui sont des tumeurs malignes très agressives.

Le gène *NF1* a récemment été décrit comme une des cibles somatiques les plus fréquemment mutées en cancérologie (voir les données en ligne du projet *the cancer genome atlas* incluant plus de 3 000 tumeurs de 12 types différents). Au-delà de la NF1 et des maladies rares, ce modèle de coopération entre les anomalies somatiques de la voie RAS-MAPK et du PRC2 pourrait ainsi s'appliquer à d'autres types tumoraux sporadiques, qui se révèleraient alors potentiellement sensibles à ces nouvelles épithérapies. ◊

PRC2 alterations in NF1-associated malignant peripheral nerve sheath tumors: Schwann cells with no complex

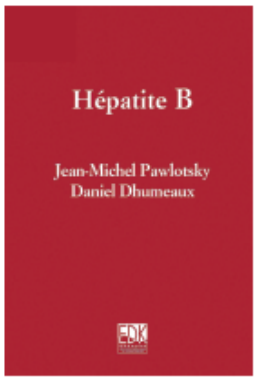
LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

1. Schubbert S, Shannon K, Bollag G. Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. *Nat Rev Cancer* 2007 ; 7 : 295-308.
2. Bentires-Alj M, Kontaridis MI, Neel BG. Stops along the RAS pathway in human genetic disease. *Nat Med* 2006 ; 12 : 283-5.
3. Sabbagh A, Pasmant E, Imbard A, *et al.* NF1 molecular characterization and neurofibromatosis type I genotype-phenotype correlation: the French experience. *Hum Mutat* 2013 ; 34 : 1510-8.
4. Pasmant E, Sabbagh A, Spurlock G, *et al.* NF1 microdeletions in neurofibromatosis type 1: from genotype to phenotype. *Hum Mutat* 2010 ; 31 : E1506-18.
5. Sabbagh A, Pasmant E, Laurendeau I, *et al.* Unravelling the genetic basis of variable clinical expression in neurofibromatosis 1. *Hum Mol Genet* 2009 ; 18 : 2768-78.
6. Pasmant E, Sabbagh A, Masliah-Planchon J, *et al.* Role of noncoding RNA ANRIL in genesis of plexiform neurofibromas in neurofibromatosis type 1. *J Natl Cancer Inst* 2011 ; 103 : 1713-22.
7. Margueron R, Reinberg D. The Polycomb complex PRC2 and its mark in life. *Nature* 2011 ; 469 : 343-9.
8. Ntziachristos P, Tsirigos A, Van Vlierberghe P, *et al.* Genetic inactivation of the polycomb repressive complex 2 in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat Med* 2012 ; 18 : 298-301.
9. De Raedt T, Beert E, Pasmant E, *et al.* PRC2 loss amplifies Ras-driven transcription and sensitizes cancers to epigenetic-based therapies. *Nature* 2014 (sous presse).
10. Filippakopoulos P, Knapp S. Targeting bromodomains: epigenetic readers of lysine acetylation. *Nat Rev Drug Discov* 2014 ; 13 : 337-56.
11. Pasmant E, Laurendeau I, Sabbagh A, *et al.* ANRIL ou l'étrange histoire d'un grand ARN non codant. *Med Sci (Paris)* 2010 ; 26 : 564-6.

Bon de commande



ISBN : 978-2-8425-4131-6 576 pages

À retourner à EDK, 109, avenue Aristide Briand - 92541 Montrouge Cedex
Tél. : 01 41 17 74 05 - Fax : 01 55 64 13 94 - E-mail : edk@edk.fr

NOM : ..... Prénom : .....
Adresse : .....
Code postal : ..... Ville : .....
Pays : .....
Fonction : .....

Je souhaite recevoir l'ouvrage **Hépatite B** : 54 € + 3 € de port = **57 € TTC** offre exceptionnelle réservée aux abonnés à m/s jusqu'au 31 décembre 2014

en ..... exemplaire, soit un total de ..... €

❒ Par chèque, à l'ordre de **E D K**
❒ Par carte bancaire : ❒ Visa ❒ Eurocard/Mastercard

Carte n° | | | | | | | | | | | | | | | | Signature :

Date d'expiration : | | | | |

N° de contrôle au dos de la carte : | | | |

ANNEXE 3

LETTER

doi:10.1038/nature13561

PRC2 loss amplifies Ras-driven transcription and confers sensitivity to BRD4-based therapies

Thomas De Raedt[1,2,3], Eline Beert[4*†], Eric Pasmant[5,6*], Armelle Luscan[5,6], Hilde Brems[4], Nicolas Ortonne[5,6], Kristian Helin[7,8,9], Jason L. Hornick[10], Victor Mautner[11], Hildegard Kehrer-Sawatzki[12], Wade Clapp[13], James Bradner[2,14], Michel Vidaud[5,6], Meena Upadhyaya[15], Eric Legius[4,16] & Karen Cichowski[1,2,3]

The polycomb repressive complex 2 (PRC2) exerts oncogenic effects in many tumour types[1]. However, loss-of-function mutations in PRC2 components occur in a subset of haematopoietic malignancies, suggesting that this complex plays a dichotomous and poorly understood role in cancer[2,3]. Here we provide genomic, cellular, and mouse modelling data demonstrating that the polycomb group gene *SUZ12* functions as tumour suppressor in PNS tumours, high-grade gliomas and melanomas by cooperating with mutations in *NF1*. *NF1* encodes a Ras GTPase-activating protein (RasGAP) and its loss drives cancer by activating Ras[4]. We show that *SUZ12* loss potentiates the effects of *NF1* mutations by amplifying Ras-driven transcription through effects on chromatin. Importantly, however, *SUZ12* inactivation also triggers an epigenetic switch that sensitizes these cancers to bromodomain inhibitors. Collectively, these studies not only reveal an unexpected connection between the PRC2 complex, *NF1* and Ras, but also identify a promising epigenetic-based therapeutic strategy that may be exploited for a variety of cancers.

The Ras pathway is commonly deregulated in cancer[5]. Oncogenic *RAS* mutations occur in approximately 30% of tumours; however, mutations in upstream regulators and downstream effectors are also prevalent[5]. Irrespective of aetiology, the oncogenic Ras signal is frequently potentiated as cancers progress, in some instances through amplification of mutant *RAS* genes or suppression of negative feedback pathways[6–9]. It is likely that many unknown mechanisms contribute to this emerging aspect of tumour evolution.

Mutations in RasGAP genes promote Ras activation in many cancers[4,10,11]. Defects in the *NF1* RasGAP underlie a familial cancer syndrome (NF1), sporadic glioblastomas (GBMs), neuroblastomas and lung cancer[4]. Interestingly, some severely affected patients with NF1 (NF1 microdeletion patients) carry germline deletions of *NF1* and 13 surrounding genes[12,13]. These individuals develop thousands of benign tumours and can exhibit a fourfold increased risk of malignancies[14,15], suggesting that a cooperating tumour suppressor lies within this region. If true, this gene might affect the development of tumours in patients with NF1 and in sporadic cancers, which frequently possess large 17q deletions[16]. Therefore, we analysed 51 malignant peripheral nerve sheath tumours (MPNSTs), the most common NF1-associated malignancy, from patients with and without an NF1 microdeletion. Array comparative genomic hybridization revealed heterozygous and homozygous deletions of *SUZ12*, a gene within the microdeletion, which encodes a component of the PRC2 (Fig. 1a, Extended Data Fig. 1a and Extended Data Table 1). Deletions in *EED*, another PRC2 component, were also prevalent in both populations. Moreover, inactivating mutations in *SUZ12* and *EED* were frequently present (Fig. 1a, Extended Data Fig. 1b, c and Supplementary Information). Together, 79% of microdeletion and 34% of non-microdeletion tumours exhibited homozygous loss of *SUZ12* or *EED*; however, 53% of non-microdeletion MPNSTs harboured one or more PRC2 mutations/deletions (Fig. 1b). These observations suggest that PRC2 inactivation may play a critical role in MPNST development.

SUZ12 and H3K27me3 were undetectable in primary MPNSTs harbouring *SUZ12* mutations and in four *NF1*-deficient human MPNST cell lines (Extended Data Fig. 1d, e and Fig. 1c). *SUZ12* reconstitution restored H3K27me3, reduced proliferation and triggered cell death in low serum (Fig. 1c, d and Extended Data 1f). The *SUZ12* lentivirus did not affect *SUZ12* wild-type cells (Extended Data Fig. 1g). Conversely, *SUZ12* ablation enhanced colony growth of *NF1*-deficient (U251 (ref. 17)) but not *NF1* wild-type GBM cells (Fig. 1e and Extended Data Fig. 1h). Partly effective short hairpin RNAs (shRNAs) exerted a disproportionate suppressive effect on H3K27Me3 and promoted colony growth of U251 cells, albeit less efficiently (Fig. 1e). These results suggest that reduced PRC2 dosage might also contribute to tumour development, which could be relevant in the setting of heterozygous *SUZ12*/*EED* mutations (Fig. 1b). Finally, *SUZ12* ablation enhanced colony growth of *NF1*-deficient but not *NF1* wild-type melanoma cells (Fig. 1f and Extended Data Fig. 1i).

To assess the cooperativity of these genes further, $Nf1^{+/-}$; $Suz12^{+/-}$ '*cis*' mice, carrying mutations on the same chromosome, were generated to recapitulate the genetics of microdeletion patients and spontaneous tumours. Tumours in *Nf1* mouse models are driven by spontaneous loss of wild-type chromosome 11 (ref. 18), resulting in *Nf1* and *Suz12* loss (Extended Data Fig. 2a). $Nf1^{+/-}$; $Suz12^{+/-}$ mice were highly tumour prone and exhibited decreased survival (Fig. 2a). Notably, mice developed lesions associated with both germline and spontaneous *NF1* mutations in humans, including neurofibromas, MPNSTs, schwannomas, melanocytic nevi and intestinal adenomas (Fig. 2b and Extended Data Fig. 2b)[4]. Genomic human tumour data demonstrate that at least one allele of *NF1* and *SUZ12* are co-deleted/mutated in 24% of melanomas (Fig. 2c). Moreover, *EED* deletions/mutations are present in 44% of *NF1*-mutant tumours, most of which also lack one *SUZ12* allele.

To investigate *SUZ12* in MPNST development further, mice harbouring *cis* mutations in *Nf1*, *p53* and *Suz12* were also generated, as combined *NF1*/*p53* mutations drive MPNST formation[18–20] (Supplementary Information). These *Nf1*/*p53*/*Suz12* mice exhibited decreased survival and developed MPNSTs on average 2.3 months earlier than *Nf1*/*p53* mutant

[1]Genetics Division, Department of Medicine, Brigham and Women's Hospital, Boston, Massachusetts 02115, USA. [2]Harvard Medical School, Boston, Massachusetts 02115, USA. [3]Ludwig Center at Dana-Farber/Harvard Cancer Center, Boston, Massachusetts 02115, USA. [4]Department of Human Genetics, Catholic University Leuven, 3000 Leuven, Belgium. [5]INSERM UMR_S745 et EA7331, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, 75006 Paris, France. [6]Service de Biochimie et Génétique Moléculaire, Hôpital Cochin, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, 75014 Paris, France. [7]Biotech Research and Innovation Centre (BRIC), University of Copenhagen, 2200 Copenhagen, Denmark. [8]Center for Epigenetics, University of Copenhagen, 2200 Copenhagen, Denmark. [9]The Danish Stem Cell Center (Danstem), University of Copenhagen, 2200 Copenhagen, Denmark. [10]Department of Pathology, Brigham and Women's Hospital, Boston, Massachusetts 02115, USA. [11]Department of Maxillofacial Surgery, University Medical Centre, Hamburg-Eppendorf, 20246 Hamburg, Germany. [12]Institute of Human Genetics, University of Ulm, 89081 Ulm, Germany. [13]Herman Wells Center for Pediatric Research, Department of Pediatrics, Indiana University School of Medicine, 46202 Indianapolis, Indiana, USA. [14]Department of Medical Oncology, Dana-Farber Cancer Institute, Massachusetts 02115, USA. [15]Institute of Medical Genetics, Cardiff University, Heath Park, Cardiff CF14 4XN, UK. [16]Center for Human Genetics, University Hospital Leuven, 3000 Leuven Belgium. †Present address: Laboratory of Aquatic Biology, Interdisciplinary Research Facility Life Sciences, Katholieke Universiteit, Leuven Afdeling Kortrijk, 8500 Kortrijk, Belgium.
*These authors contributed equally to this work.

©2014 Macmillan Publishers Limited. All rights reserved

RESEARCH LETTER

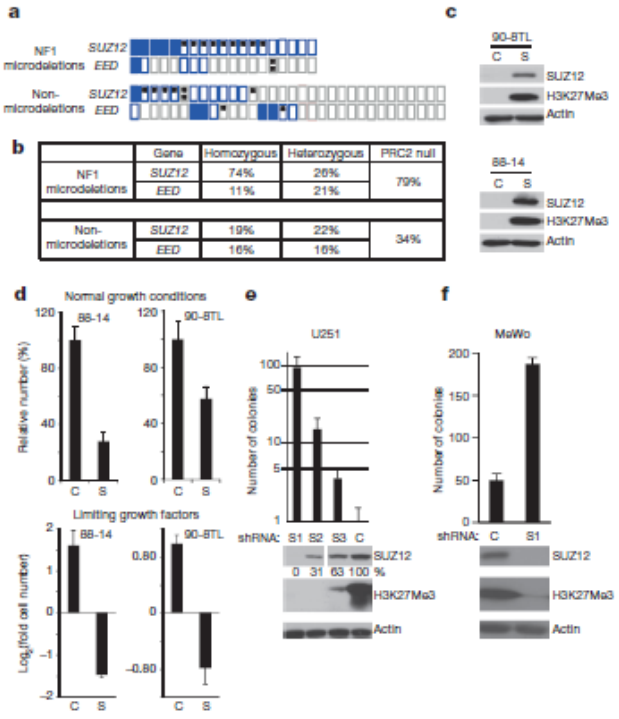
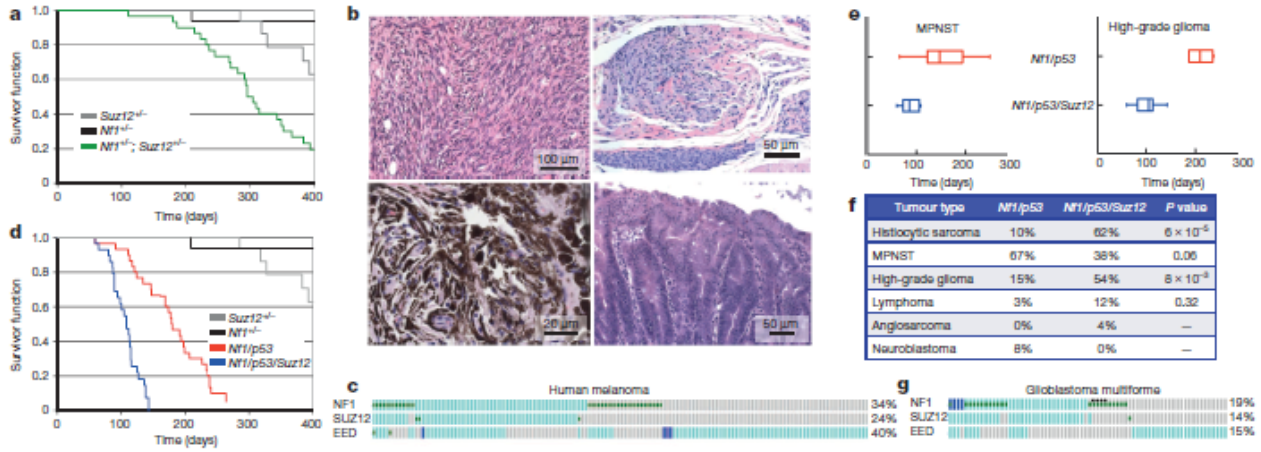


Figure 1 | PRC2 components are deleted or mutated in human MPNSTs and exert tumour-suppressive activity. **a**, Schematic visualization of distinct genomic alterations in *SUZ12* and *EED* in *NF1*-deficient human MPNSTs from patients with and without an NF1 microdeletion (asterisk, mutation; open blue rectangle, hemizygous deletion; filled blue rectangle, homozygous deletion; grey rectangle, no copy number loss). **b**, Table indicating the percentage of human MPNSTs with homozygous or heterozygous loss of *SUZ12*, *EED* and *PRC2*. **c**, Immunoblots of lysates from human MPNST cells reconstituted with *SUZ12* (C, *LacZ* control; S, *SUZ12*). Restoration of H3K27me3 shows that the functionality of the PRC2 complex is restored upon *SUZ12* reconstitution. **d**, Human MPNST cell lines with reconstituted *SUZ12* exhibit reduced proliferation under normal growth conditions (10% serum, 3 days). *SUZ12* reconstitution (S) causes cell death when cells are cultured under limiting growth factors (2% serum, 6 days). Proliferation curves are shown in Extended Data Fig. 1f. **e**, Top, graph depicting colony growth in soft agar using the *NF1*-deficient human GBM line (U251), expressing a control shRNA construct (C, short hairpin green fluorescent protein (shGFP)) or three distinct SUZ12 shRNA constructs against SUZ12 (S1–S3). Bottom, immunoblots depicting knockdown of SUZ12 to varying levels (S1–S3) compared with control (shGFP). The percentage of SUZ12 remaining is quantified. **f**, Effects of shSUZ12 (S1) on SUZ12 expression and colony formation in MEWO melanoma cells, which are *NF1* null. Error bars, s.d. ($n = 3$, biological replicates).

mice (Fig. 2d, e). All MPNSTs arose in less than 3.5 months, whereas MPNSTs in *Nf1/p53* mice required up to 9 months. Nevertheless, fewer *Nf1/p53/Suz12* animals developed MPNSTs, most probably because of the increase in other tumour types (Fig. 2f). Strikingly, 54% of *Nf1/p53/Suz12* mice developed high-grade gliomas and did so on average in approximately 3 months, a latency shorter than most models (Fig. 2e, f and Extended Data Fig. 2d). *NF1* and *SUZ12* were co-deleted/mutated in 14% of human GBMs (Fig. 2g). *EED* deletions were also detected in 26% of *NF1*-mutant tumours, which all lacked a copy of *SUZ12*, highlighting the co-occurrence of defects in *NF1* and PRC2.

SUZ12 ablation causes a loss of H3K27me3 and in some settings promotes a consequential increase in H3K27Ac[21]: a transcriptional activating signal that recruits bromodomain proteins and associated transcription factors[22]. As such, we reasoned that *SUZ12*-mutant MPNSTs might be sensitive to bromodomain inhibitors such as JQ1[23]. Importantly, *SUZ12* reconstitution increased H3K27me3 and decreased H3K27Ac in MPNST



Tumour type	*Nf1/p53*	*Nf1/p53/Suz12*	*P* value
Histiocytic sarcoma	10%	62%	6×10^{-5}
MPNST	67%	38%	0.06
High-grade glioma	15%	54%	8×10^{-3}
Lymphoma	3%	12%	0.32
Angiosarcoma	0%	4%	—
Neuroblastoma	8%	0%	—

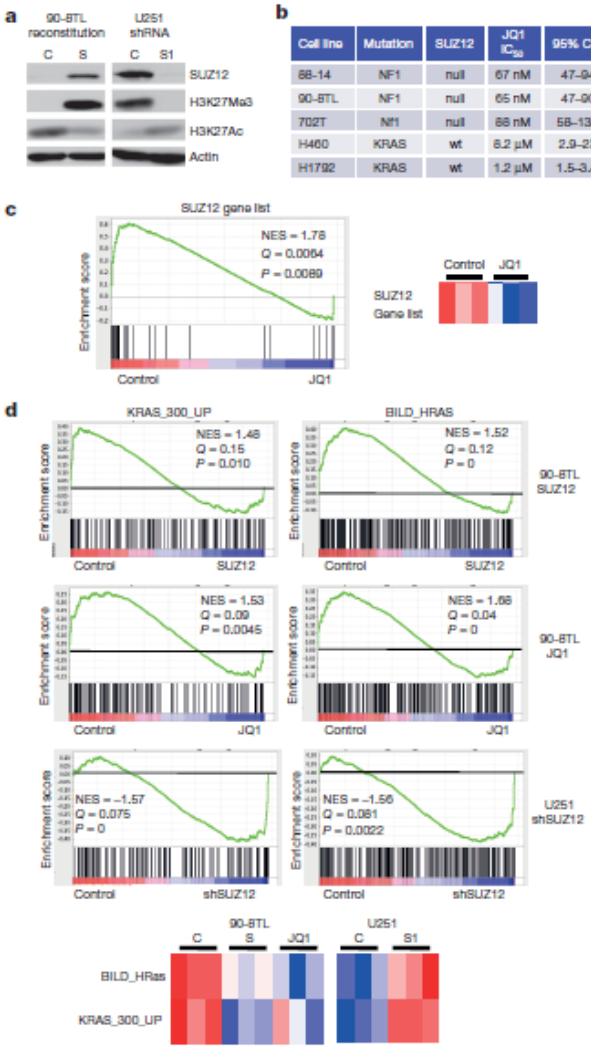
Figure 2 | *Suz12* and *Nf1* mutations cooperate to promote widespread tumour development in mice. **a**, Kaplan–Meier curve comparing survival of $Suz12^{+/-}$ ($n = 15$), $Nf1^{+/-}$ ($n = 15$) and $Nf1^{+/-}$; $Suz12^{+/-}$ ($n = 30$) mice in *cis* ($NS^{+/-}$). $Nf1^{+/-}$; $Suz12^{+/-}$ mice have a significantly reduced survival ($Nf1^{+/-}$; $Suz12^{+/-}$ versus $Suz12^{+/-}$, $P = 1.99 \times 10^{-4}$; $Nf1^{+/-}$; $Suz12^{+/-}$ versus $Nf1^{+/-}$, $P = 2.87 \times 10^{-8}$; Mantel–Cox test). **b**, Haematoxylin and eosin staining of an MPNST (top left), neurofibroma (top right), melanocytic nevus (bottom left) and intestinal adenoma (bottom right) in $Nf1^{+/-}$; $Suz12^{+/-}$ mice. **c**, Oncoprint output of the melanoma TCGA data (cBioPortal) (green square, mutation; light blue rectangle, hemizygous deletion; dark blue rectangle, homozygous deletion; grey rectangle, unaltered). **d**, Kaplan–Meier curve comparing survival of $Suz12^{+/-}$, $Nf1^{+/-}$, $Nf1^{+/-}/p53^{+/-}$ mice ($n = 30$) in *cis* ($NP^{+/-}$) and $Nf1^{+/-}$ $p53^{+/-}$ $Suz12^{+/-}$ mice in *cis* ($NPS^{+/-}$). *Nf1/p53/Suz12* mice have a significantly lower survival ($P = 1.2 \times 10^{-9}$, Mantel–Cox test). **e**, Left, box plot comparing the age at onset for MPNSTs in *Nf1/p53* and *Nf1/p53/Suz12* mice. MPNSTs from *Nf1/p53/Suz12* mice have a significantly shorter latency (on average 2.3 months; $P = 2.8 \times 10^{-4}$, Mann–Whitney *U*-test). Right, box plot comparing the age at onset for high-grade glioma in *Nf1/p53* and *Nf1/p53/Suz12* mice. High-grade gliomas in *Nf1/p53/Suz12* mice develop on average around 3 months and have a significantly shorter latency ($P = 0.0003$, Mann–Whitney *U*-test). **f**, Table comparing the percentages of *Nf1/p53* and *Nf1/p53/Suz12* mice that develop specific tumours. *P* values indicate significance by Fisher's exact test. **g**, Oncoprint output of the glioblastoma TCGA data (cBioPortal) (green square, mutation; light blue rectangle, hemizygous deletion; dark blue rectangle, homozygous deletion; black dot, second hit mutation). Co-occurrence of defects in *NF1* and the PRC2 complex (NF1–SUZ12, odds ratio >10, $P < 10^{-4}$; NF1–EED, odds ratio 2–10, $P = 2.2 \times 10^{-4}$).

©2014 Macmillan Publishers Limited. All rights reserved

cells, whereas *SUZ12* ablation decreased H3K27me3 and increased H3K27Ac (Fig. 3a). Moreover, *SUZ12*-deficient MPNSTs were more sensitive to JQ1 than PRC2 wild-type cells (Fig. 3b).

Transcriptional profiling analysis was conducted in MPNSTs, in the presence/absence of *SUZ12* or JQ1. Gene set enrichment analysis (GSEA) and single-sample (ss)GSEA demonstrated that the gene set suppressed by *SUZ12* was also suppressed by JQ1 (Supplementary Table 1 and Fig. 3c). Using the Molecular Signatures Database we found that PRC2-regulated genes were suppressed both in *SUZ12*-reconstituted and JQ1-treated cells, suggesting that JQ1 counteracts *SUZ12* loss, in part, by repressing PRC2 targets (Extended data Fig. 3a, b). Unlike other tumours, neither JQ1 nor *SUZ12* suppressed *MYC* genes (Extended Data Fig. 3c). However, *MYC* genes are not upregulated and do not drive MPNST development. Surprisingly, *SUZ12* and JQ1 also suppressed genes associated with oncogenic Ras transcriptional signatures (Fig. 3d and Extended Data Fig. 3a). Conversely, Ras signatures were enhanced when *SUZ12* was ablated in *NF1*-mutant GBM cells (Fig. 3d). Phospho-ERK was unaffected by *SUZ12* loss, reconstitution, or JQ1 treatment (Extended Data Fig. 3d), suggesting that *SUZ12* loss amplifies Ras transcriptional output via direct effects on chromatin, and that JQ1 may counteract effects by suppressing Ras signature genes.

There are no effective therapies for MPNSTs[24]. While *SUZ12*-mutant MPNSTs were sensitive to JQ1, in contrast to c-Myc driven tumours, the effects were cytostatic[25,26]. Given the importance of Ras in MPNSTs, we investigated whether JQ1 might cooperate with Ras pathway inhibitors.



JQ1 was evaluated in combination with an mTOR inhibitor (rapamycin), or a MEK inhibitor (PD-901) as both effectors function in *NF1*-deficient tumours[27–30]. Only PD-901/JQ1 treatment killed MPNSTs (Fig. 4a). Genetic ablation of BRD4 similarly cooperated with PD-901 (Extended Data Fig. 4a, b). *SUZ12* suppression conferred sensitivity to PD-901/JQ1 in other *NF1*-deficient tumour cells, including GBM and colon cancer, whereas *SUZ12* suppression did not affect *NF1* wild-type cells (Extended Data Fig. 4c and Supplementary Information).

To elucidate the cooperativity between BRD4 and MEK inhibitors, transcriptional profiling and chromatin immunoprecipitation followed by sequencing (ChIP-seq) experiments were performed. We compiled a list of publicly available upregulated Ras signature genes significantly repressed by JQ1, PD-901 or JQ1/PD901 in MPNSTs (Supplementary Table 2 and Supplementary Information). PD-901 suppressed a high percentage (58%) of these Ras signature genes (Fig. 4b, blue boxes) and JQ1 suppressed 29% (yellow boxes). However, JQ1/PD-901 cooperated to suppress this Ras signature in several ways. Not only did JQ1 suppress genes unaffected by PD-901, but the JQ1/PD-901 combination enhanced or uniquely suppressed 26% of these genes (green boxes). ssGSEA of our Ras signature gene set confirmed the cooperative effects of PD901 and JQ1 (Fig. 4c). H3K27Ac and BRD4 were significantly enriched at promoters of JQ1/PD-901 suppressed targets (Fig. 4b, red boxes) and BRD4 was displaced at 53% of sites (red boxes with dots), as shown in Fig. 4d. Transcription factors including ETS1, a known master regulator of Ras-driven transcription, were suppressed by JQ1/PD-901.

Finally, PD-901 and JQ1 were evaluated in *Nf1/p53/Suz12* mice (Fig. 4e). PD-901 did not affect MPNSTs, whereas JQ1 exerted modest, cytostatic effects. However, combined JQ1/PD-901 triggered significant tumour regression. On average, tumours shrank 67%; however, half of them shrank by at least 75%. On the basis of their mechanism of development, tumours from *Nf1/p53* mice are *SUZ12* heterozygous, recapitulating an additional subset of human tumours (Fig. 1b). Consistent with shRNA studies (Fig. 1e), tissue from $Suz12^{+/-}$ mice revealed a disproportionate loss of H3K27me3 (Fig. 4f), potentially conferring sensitivity to PD-901/JQ1. Indeed, $Nf1^{-/-}$;$p53^{-/-}$;$Suz12^{+/-}$ tumours shrank up to 68% (Fig. 4g), albeit overall less than tumours in *Nf1/p53/Suz12* mice. Notably, H3K27me3 antibodies faithfully detected PRC2 defects in primary human tumours (Fig. 4h, Extended Data Fig. 4d and

Figure 3 | SUZ12 and JQ1 regulate PRC2 targets and the Ras transcriptional signature. a, Left, immunoblots showing the epigenetic switch from H3K27Ac to H3K27Me3 upon *SUZ12* reconstitution in human 90-8TL MPNST cells (C, LacZ; S, *SUZ12* reconstitution; H3K27Me3 expression included here with immunoblots is also shown in Fig. 1c). Right, epigenetic switch from H3K27Me3 to H3K27Ac upon *SUZ12* knockdown in *NF1*-deficient GBMs (U251) (C, scramble shRNA; S1, SUZ12 shRNA). **b**, Half-maximum inhibitory concentration (IC_{50}) values of JQ1 in cell lines null and wild type (WT) for *SUZ12* and *NF1* as indicated. 702T cells are *Nf1/p53/suz12* null MPNSTs derived from our mouse tumours. *KRAS* mutant/*SUZ12* WT H460 and H1792 lung cancer lines were used as a comparison. 95% CI, 95% confidence interval. **c**, Top, signature enrichment plot comparing the SUZ12 signature (genes downregulated in response to SUZ12 reconstitution; Supplementary Table 1) in MPNST cells treated with vehicle versus JQ1 (100 nM, 24 h, triplicate samples). Plot indicates that SUZ12-regulated genes are more highly expressed in control than JQ1-treated samples (red, upregulation; blue, downregulation). NES, normalized enrichment score. Bottom, heat map of the enrichment scores of SUZ12 downregulated genes in vehicle (control) and JQ1 (three replicates) (red, upregulation; blue, downregulation). **d**, Top, Ras signature enrichment plots (using KRAS_300_UP.V1_UP and BILD_HRAS signature data sets obtained from the Molecular Signatures Database) in MPNSTs (90-8TL) reconstituted with SUZ12 versus control vector or treatment with JQ1 versus vehicle control (100 nM, 24 h, triplicate samples) and in the human GBM line U251 after knockdown of SUZ12 (shSUZ12 S1). Plots indicate a significant downregulation of RAS signatures after SUZ12 reconstitution and JQ1 treatment, and a significant upregulation of RAS signatures in *SUZ12*-depleted cells. Bottom, heat map of the enrichment scores of Ras signatures in control (C, LacZ), *SUZ12*-reconstituted (S) and JQ1-treated MPNST cells (three replicates), and in control (C, *shScramble*) and SUZ12-ablated (S1, *shSUZ12*) U251 cells (three replicates) (red, upregulation; blue, downregulation).

©2014 Macmillan Publishers Limited. All rights reserved

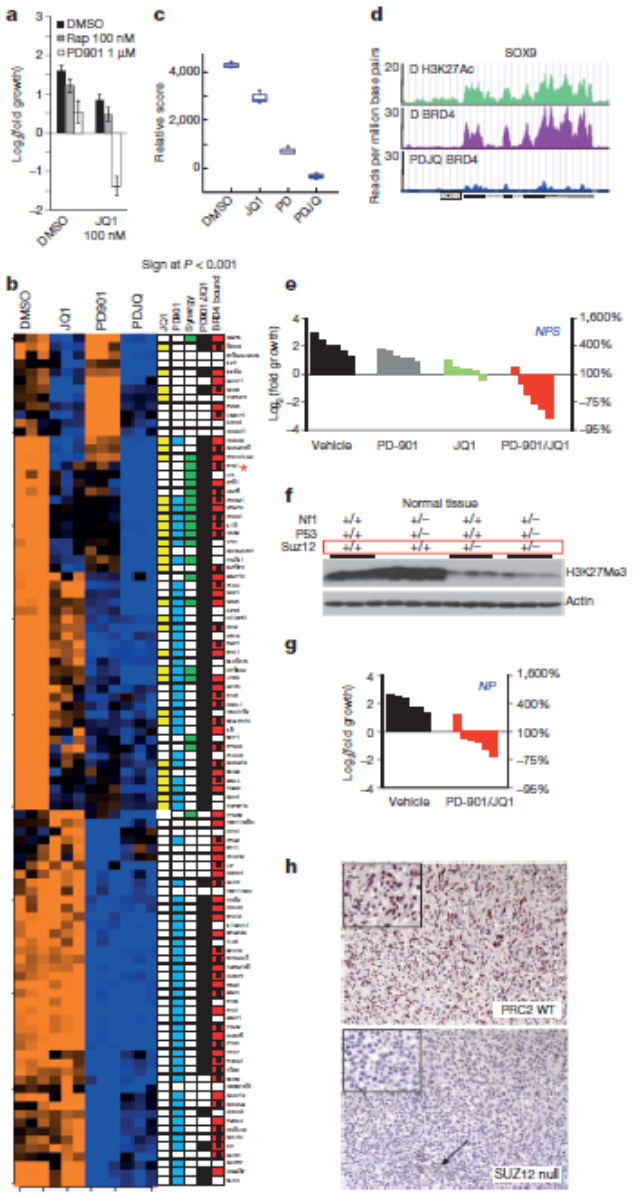


Figure 4 | JQ1 and MEK inhibitors cooperate to promote cell death, suppress Ras transcriptional output and promote tumour regression. **a**, Log_2 of fold change in MPNST cell number (90-8TL). Only cells treated with PD-901 and JQ1 die. Error bars, s.d. ($n = 3$, biological replicate). **b**, Heat map of microarray expression data evaluating the effects of the indicated drugs in *SUZ12/NF1* null cell line 90-8TL (Ras signature gene set: see Supplementary Table 2). Genes significantly ($P < 0.001$) downregulated are indicated (JQ1, yellow; PD901, blue; PD901/JQ1, black). Genes uniquely or more potently suppressed by PD901/JQ1 are indicated in green. BRD4-bound genes are indicated in red. H3K27Ac and BRD4 were significantly enriched at the promoters of downregulated genes (compared with overall genes bound; 72% versus 46%, Fisher's exact test, $P = 7.9 \times 10^{-3}$). A red box with black square denotes a minimum fourfold displacement of BRD4 in response to PD901/JQ1. H3K27Ac and BRD4 binding overlaps at 69/71 promoters. **c**, Box plot of ssGSEA comparing the enrichment of our Ras signature gene set after treatments. The output shows cooperativity of JQ1 and PD901 in suppressing this Ras signature ($n = 3$, biological replicate). **d**, Gene tracks of H3K27Ac and BRD4 ChIP-seq occupancy at SOX9 after DMSO or PD901/JQ1 treatment (*y* axis, reads per million base pairs). **e**, Waterfall plot of MPNSTs from *Nf1/p53/Suz12* mice treated with vehicle control, PD-0325901, JQ1 or a combination of PD-0325901 and JQ1 (10 days). **f**, Immunoblots of H3K27me3 in lung tissue of WT, *Nf1/p53*, *SUZ12*$^{+/-}$ and *Nf1/p53/Suz12* mice. H3K27Me3 levels are disproportionately low in all animals carrying one mutant *SUZ12* allele. **g**, Waterfall plot of MPNSTs from *Nf1/p53* mice comparing vehicle with combination of PD-0325901 and JQ1 ($P = 5.4 \times 10^{-4}$, *t*-test). **h**, Immunohistochemistry comparing H3K27me3 expression in a human MPNST that is WT for PRC2 genes (P6) and a SUZ12 null tumour (P7). Arrow depicts positive staining of blood vessel. An additional tumour set is shown in Extended Data Fig. 4d, and results from all primary MPNSTs that were evaluated are shown in Extended Data Table 1.

Extended Data Table 1). Together, these studies reveal a promising therapeutic strategy for MPNSTs, and suggest that PRC2 genetic alterations or H3K27me3/H3K27Ac levels could be used as biomarkers for selection of patients.

While the PRC2 complex is oncogenic in many cancers, these studies reveal an important tumour-suppressive function for two PRC2 components in *NF1*-deficient solid tumours. Moreover, this complex appears to function as a rheostat for Ras-dependent transcription. It is becoming apparent that the oncogenic Ras signal is amplified as cancers progress. Because *NF1*-mutant tumours are driven by a relatively weak oncogenic signal and lack an amplifiable mutant *RAS* allele, *SUZ12* loss may be a particularly important mechanism of signal potentiation. PRC2 inactivation may also enhance Ras-driven transcription in *RAS*-mutant cancers. However, further studies will be required to assess this possibility.

Additionally, these studies demonstrate that *SUZ12* loss promotes an epigenetic switch from H3K37Me3 to H3K27Ac, conferring sensitivity to BRD4 inhibitor-based combination therapies. Our data suggest that BRD4 inhibitors alone may not be effective in these tumours, but should be evaluated in combination with MEK inhibitors. However, this work may also have other important clinical implications. EZH2 inhibitors have therapeutic potential in cancers with mutated or overexpressed *EZH2*. Given the prevalence of *SUZ12* and *EED* alterations, it may be prudent to screen for these events in broader clinical trials, as EZH2 inhibitors could exacerbate potential pro-tumorigenic effects of heterozygous alterations. Regardless, these studies reveal a mechanistic link between Ras and PRC2, and provide a scientific rationale for developing a new therapeutic combination for tumours that are currently untreatable.

Online Content Methods, along with any additional Extended Data display items and Source Data, are available in the online version of the paper; references unique to these sections appear only in the online paper.

Received 4 December 2013; accepted 6 June 2014.
Published online 13 August 2014.

1. Sauvageau, M. & Sauvageau, G. Polycomb group proteins: multi-faceted regulators of somatic stem cells and cancer. *Cell Stem Cell* **7**, 299–313 (2010).
2. Ernst, T. *et al.* Inactivating mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myeloid disorders. *Nature Genet.* **42**, 722–726 (2010).
3. Zhang, J. *et al.* The genetic basis of early T-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. *Nature* **481**, 157–163 (2012).
4. Maertens, O. & Cichowski, K. An expanding role for RAS GTPase activating proteins (RAS GAPs) in cancer. *Adv. Biol. Regul.* **55**, 1–14 (2014).
5. Downward, J. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nature Rev. Cancer* **3**, 11–22 (2003).
6. Shaw, A. T. *et al.* Sprouty-2 regulates oncogenic K-ras in lung development and tumorigenesis. *Genes Dev.* **21**, 694–707 (2007).
7. Feldser, D. M. *et al.* Stage-specific sensitivity to p53 restoration during lung cancer progression. *Nature* **468**, 572–575 (2010).
8. Junttila, M. R. *et al.* Selective activation of p53-mediated tumour suppression in high-grade tumours. *Nature* **468**, 567–571 (2010).
9. Xu, J. *et al.* Dominant role of oncogene dosage and absence of tumor suppressor activity in Nras-driven hematopoietic transformation. *Cancer Discov.* **3**, 993–1001 (2013).
10. McLaughlin, S. K. *et al.* The RasGAP gene, *RASAL2*, is a tumor and metastasis suppressor. *Cancer Cell* **24**, 365–378 (2013).
11. Min, J. *et al.* An oncogene-tumor suppressor cascade drives metastatic prostate cancer by coordinately activating Ras and nuclear factor-κB. *Nature Med.* **16**, 286–294 (2010).
12. De Raedt, T. *et al.* Genomic organization and evolution of the NF1 microdeletion region. *Genomics* **84**, 346–360 (2004).
13. Lopez-Correa, C. *et al.* Recombination hotspot in NF1 microdeletion patients. *Hum. Mol. Genet.* **10**, 1387–1392 (2001).

©2014 Macmillan Publishers Limited. All rights reserved

Drug treatment, dosing schedule and tumour volume measurements. Only mice that developed an MPNST that was readily measurable by Vernier callipers were included in the study. As these tumours develop spontaneously over time, and to ensure adequate randomization, mice were sequentially enrolled per treatment arm, starting with the combination treatment arm. The investigator was not blinded. To have sufficient power (80%) to detect a minimum of 50% tumour shrinkage versus day 0 ($P = 0.05$), we enrolled six animals per treatment group. Mice were enrolled in the study when tumour size reached 300–700 mm^3. Tumour size was measured every 2–3 days by Vernier callipers. Tumour volume was calculated using the standard formula $L \times W^2 \times 52$. Tumour volume and $\log_2$ of fold growth versus day 0 were calculated and plotted on a graph. JQ1 (45 mg/kg) was administered intraperitoneally daily in a 10% (2-hydroxypropyl)-β-cyclodextrin solution (C0926, Sigma). PD-0325901 was administered by oral gavage daily at 1.5 mg/kg (vehicle (0.5% (w/v) methylcellulose solution with 0.2% (v/v) polysorbate 80 (Tween 80)). Compounds given in combination were administered sequentially.

Statistics. Unless otherwise stated, all statistical analysis used SYSTAT 12 software. For each data set, basic statistical values (mean and s.d.) were calculated and normality determined (Shapiro–Wilk normality test); all data sets were normally distributed. All fold change tumour volumes for the different drug combinations were compared by Student's *t*-test (unequal variance). Survival analysis used the Mantel–Cox test. The statistical tests used are mentioned throughout the text.

31. Subramanian, A. *et al.* Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **102,** 15545–15550 (2005).
32. Jacks, T. *et al.* Tumour predisposition in mice heterozygous for a targeted mutation in Nf1. *Nature Genet.* **7,** 353–361 (1994).
33. Pasini, D., Bracken, A. P., Jensen, M. R., Lazzerini Denchi, E. & Helin, K. Suz12 is essential for mouse development and for EZH2 histone methyltransferase activity. *EMBO J.* **23,** 4061–4071 (2004).

ANNEXE 4: Altérations de *SUZ12* et *EED* au sein des 51 tumeurs et résultats des immunohistochimies (IHC) H3K27me3

Les mutations ponctuelles sont représentées en rouge. Les IHC concordantes avec le génotypage sont indiquées en gras souligné. Trois IHC de MPNST surlignées en jaune montrent une perte du marquage H3K27me3 alors qu'aucune altération génotypique des gènes testés n'a été retrouvée.

Echantillons	*SUZ12*		*EED*		IHC H3K27me3
	1er hit	2ème hit	1er hit	2ème hit	
L1	Microdélétion de type 1	**c.1430del; p.(Asn477Thrfs*11)**	chr11.hg19:g(62,371,439_62,341,498)_(134,927,055_134,927,114)del		Non effectué
L2	Microdélétion de type 1	**c.1768G>A; p.(Gly590Lys)**			Non effectué
L3	Microdélétion de type 2	**c.1216_1217delinsATGA, p.(Leu406Metfs*22)**	chr11.hg19:g(192,372_192,431)_(134,927,055_134,927,114)del		*Positif*
L4	Microdélétion de type 1	**c.1290T>A; p.(Tyr430*)**			Non effectué
L5	Microdélétion de type 1	chr17.hg19:g(25,318,639_25,318,698)_(34,462,427_34,462,486)del			Non effectué
L6	chr17.hg19:g(28,999,834_28,999,893)_(33,898,314_33,898,373)del	chr17.hg19:g(30,262,897_30,262,986)_(30,333,079_30,333,138)del			**Négatif**
L7	Microdélétion de type 1	Microdélétion de type 2	chr11.hg19:g(192,372_192,431)_(134,927,055_134,927,114)del		**Négatif**
L8	Microdélétion de type 1	AMPL539772636 chr17.hg19:g(30,302,436_30,302,593)del; AMPL539798640 chr17.hg19:g(30,302,585_30,302,756)del	chr11.hg19:g(85,988,023_85,988,082)_(85,988,016_85,988,075)del	chr11.hg19:g(85,988,023_85,988,082)_(85,988,016_85,988,075)del	**Négatif**
P1	Microdélétion de type 1	Microdélétion de type 3			**Négatif**
P2	chr17.hg19:g(2,537,850_2,542,770)_(44,351,152_44,787,180)del				**Négatif**
P3	chr17.hg19:g(?_47,546)_(31,644,573_31,647,854)del				Non effectué
P4	chr17.hg19:g(28,851,905_28,858,444)_(30,451,370_30,458,859)del				Non effectué

P5	Microdélétion de type 1	**c.1875-7_2113del; splice defect**			Non effectué
P6	chr17.hg19:g(?_47,546)_(43,518,341_43,651,877)del				Non effectué
P7	chr17.hg19:g(29,098,392_29,109,733)_(30,289,970_30,293,185)del		**c.874C>T; p.(Gln292*)**	CN-LOH ?	Non effectué
P8	chr17.hg19:g(29,361,835_29,375,967)_(30,604,835_30,610,001)del	**c.1851G>A; p.(Trp617*)**			Non effectué
P9	Microdélétion de type 2	**c.1356del; p.(Trp452Cysfs*4)**			**Négatif**
L9	Microdélétion de type 1	**c.1704del; p.(Ser568Argfs*14)**	Non effectué	Non effectué	Non effectué
L10	Microdélétion de type 1	**c.1293+1G>C; splice defect**	chr11.hg19:g(57,609,466_57,609,525)_(119,500,194_119,500,253)del	Recherche de mutation non effectuée	Non effectué
C1	chr17.hg19:g(26,734,612_26,734,671)_(30,333,079_30,333,138)del	**c.496del, p.(His166Thrfs*24)**	Non délété, mutation non recherchée	Non délété, mutation non recherchée	Non effectué
C2	chr17.hg19:g(26,883,246_26,883,301)_(32,578,657_32,578,716)del		chr11.hg19:g(78,800,489_78,8000,548)_(123,942,399_123,942,458)del		Non effectué
C3	chr17.hg19:g(28,121,342_28,121,401)_(34,480,451_34,480,510)del	**c.1433A>C, p.(Tyr478Ser)**	Non délété, mutation non recherchée	Non délété, mutation non recherchée	Non effectué
C4	**c.961G>T; p.(Glu321*)**		Non effectué	Non effectué	Non effectué
C5			chr11.hg19:g(84,500,047_84,500,106)_(87,671,742_87,671,801)del	chr11.hg19:g(84,500,047_84,500,106)_(87,671,742_87,671,801)del	Non effectué
C6			Non délété, mutation non recherchée	Non délété, mutation non recherchée	Non effectué
C7			Non délété, mutation non recherchée	Non délété, mutation non recherchée	Non effectué
L11	chr17.hg19:g(30,131,459_30,131,518)_(30,604,685_41,162,744)del		**c.727-8_769del; splice defect**		Non effectué
L12	chr17.hg19:g(29,169_29,228)_(35,400,357_35,400,416)del	chr17.hg19:g(30,262,897_30,262,956)_(30,651,201_30,651,260)del	chr11.hg19:g(73,390,675_73,390,734)_(134,927,055_134,927,114)del		**Négatif**
L13					**Positif**
L14			chr11.hg19:g(55,033,261_55,033,320)_(134,927,055_134,927,114)del	**c.635-1G>A; splice defect**	**Négatif**
L15					**Positif**
L16					Non effectué
L17	**c.275-46_275-2del; splice defect**	CN-LOH (incluant *NF1* + *SUZ12*) ?			Non effectué
L18	chr17.hg19:g(48,539_48,598)_(81,124,183_81,124,227)del				Non effectué

L19	chr17.hg19:g(26,152,112_26,152,171)_(31,336,208_31,336,267)del		chr11.hg19:g(55,050,707_55,050,766)_(134,927,055_134,927,114)del		**Négatif**
L20					**Positif**
L21					**Positif**
L22					**Positif**
L23					Négatif
P10			chr11.hg19:g(85,597,254_85,600,644)_(86,940,763_86,947,630)del	chr11.hg19:g(85,597,254_85,600,644)_(86,940,763_86,947,630)del	**Négatif**
P11					Non effectué
P12					Négatif
P13	**c.1564A>T; p.(Arg522*)**	CN-LOH (incluant *NF1* + *SUZ12*) ?			Non effectué
P14					Non effectué
P15	**c.731dup; p.(Met244Ilefs*10)**	CN-LOH (incluant *NF1* + *SUZ12*) ?			Non effectué
P16	chr17.hg19:g(22,218,445_25,375,449)_(35,745,659_35,754,684)del		chr11.hg19:g(85,944,362_85,952,771)_(86,336,477_86,341,086)del	chr11.hg19:g(85,944,362_85,952,771)_(86,336,477_86,341,086)de	Non effectué
P17	**c.1671_1672dup; p.(Ser558Ilefs*25)**	CN-LOH (incluant *NF1* + *SUZ12*) ?			**Négatif**
P18					Négatif
P19					**Positif**
P20					**Positif**
P21					**Positif**