



THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON
opérée au sein de
L'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale : ED340
(BIOLOGIE MOLÉCULAIRE INTÉGRATIVE ET CELLULAIRE)

Spécialité de doctorat : Biologie
Discipline : Cancérologie

Soutenue publiquement le 10/09/2020 par :

David FAHED

**Exploration des récepteurs à
dépendance dans les hémopathies
malignes**

Devant le jury composé de :

Mme. Agnès BERNET, PU, Université Claude Bernard Lyon I
M. Olivier MICHEAU, DR INSERM, Université de Bourgogne
M. Pascal SCHNEIDER, MER, Université de Lausanne
Mme. Catherine THIEBLEMONT, PU-PH, Université Paris Diderot Paris 7
M. Charles DUMONTET, PU-PH, Université Claude Bernard Lyon 1

Présidente
Rapporteur
Rapporteur
Rapporteur
Directeur de thèse

Université Claude Bernard – LYON 1

Administrateur provisoire de l'Université	M. Frédéric FLEURY
Président du Conseil Académique	M. Hamda BEN HADID
Vice-Président du Conseil d'Administration	M. Didier REVEL
Vice-Président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire	M. Philippe CHEVALLIER
Vice-Président de la Commission de Recherche	M. Jean-François MORNEX
Directeur Général des Services	M. Pierre ROLLAND

COMPOSANTES SANTE

Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directrice : Mme Anne-Marie SCHOTT
Faculté d'Odontologie	Doyenne : Mme Dominique SEUX
Faculté de Médecine et Maïeutique Lyon Sud - Charles Mérieux	Doyenne : Mme Carole BURILLON
Faculté de Médecine Lyon-Est	Doyen : M. Gilles RODE
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation (ISTR)	Directeur : M. Xavier PERROT
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques (ISBP)	Directrice : Mme Christine VINCIGUERRA

COMPOSANTES & DEPARTEMENTS DE SCIENCES & TECHNOLOGIE

Département Génie Electrique et des Procédés (GEP)	Directrice : Mme Rosaria FERRIGNO
Département Informatique	Directeur : M. Behzad SHARIAT
Département Mécanique	Directeur M. Marc BUFFAT
Ecole Supérieure de Chimie, Physique, Electronique (CPE Lyon)	Directeur : Gérard PIGNAULT
Institut de Science Financière et d'Assurances (ISFA)	Directeur : M. Nicolas LEBOISNE
Institut National du Professorat et de l'Education	Administrateur Provisoire : M. Pierre CHAREYRON
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. Christophe VITON
Observatoire de Lyon	Directrice : Mme Isabelle DANIEL
Polytechnique Lyon	Directeur : Emmanuel PERRIN
UFR Biosciences	Administratrice provisoire : Mme Kathrin GIESELER
UFR des Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives (STAPS)	Directeur : M. Yannick VANPOULLE
UFR Faculté des Sciences	Directeur : M. Bruno ANDRIOLETTI

*Cette thèse est dédiée
Tout d'abord à ma mère,
Aussi à ma grande mère, Mhabbé, et mon oncle Antoine.*

Remerciements

Je souhaite remercier en premier temps le professeur Charles DUMONTET qui m'a accepté en thèse et qui m'a accueilli dans son laboratoire pendant trois ans. Egalement, pour ses conseils multiples et le temps qu'il a consacré à diriger cette thèse.

Je tiens à remercier aussi le docteur Lars-Petter Jordheim, pour ses nombreux conseils, son encouragement et son aide.

Je souhaite remercier le docteur Patrick MEHLEN et le docteur Caroline LEROUX d'avoir fait partie de mon comité de suivi de thèse pour trois ans.

Je souhaite remercier le professeur Agnès BERNET d'avoir fait partie de mon jury de thèse.

Je souhaite remercier également, le professeur Catherine THIEBLEMONT, le docteur Olivier MICHEAU et le docteur Pascal SCHNEIDER d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ma thèse.

Je tiens à remercier madame Eva-Laure MATERA, madame Emeline PERRIAL, madame Sabine BEAUMEL, assistantes au laboratoire, pour l'aide technique qu'elles m'avaient offerte durant ces trois années.

Je remercie madame Zineb BOUSFIHA, adjointe technique, pour toute aide technique et administrative tout au long de ma thèse.

Je remercie également l'équipe de la start-up Antineo, hébergée au laboratoire, pour l'aide qu'ils m'ont offerte surtout pour réaliser les expériences in vivo.

Je remercie aussi le docteur Abdel-Kamel CHETTAB pour les conseils, pour l'aide et pour l'accompagnement tout au long de ma thèse.

Je remercie le docteur Boyan GRIGOROV, madame Maeva RUEL et madame Sophie AIRES pour leur encouragement et leurs conseils. Je vous souhaite tout le courage que vous m'avez apporté.

Je remercie madame Caroline KHADIGE, qui m'a accompagné depuis mon premier jour à Lyon, de son soutien, son encouragement et d'avoir accepté de relire et corriger mon travail.

Mention spéciale, à Gamze, Malick, Muhammad, Ramazan, Chantel, Julie, Ophélie, Christina, Gloria, Edouardo, Ludivine, Joyce, Nga, Elodie, Camilla, Octavia, Ivana, Aline et finalement Nathalie, pour tous les fous rires et les souvenirs inoubliables durant ces trois années !

Je tiens à mentionner mes chers docteurs et amis Libanais à Lyon ; Myriam ELHELOU, Tony ABI TANNOUS, Nathalie HAYECK, Bilal KABALAN, Eddy ROUHANA, Jad OUEISS et Nagham ELGHOSSEIN. A ceux-ci s'ajoutent mes chers amis : Laetitia MEOUCHI, Semaan JAMIL, Christie HAZOU, Marianne HAZOU, Marie-Joe ABI-YOUNES et les futurs docteurs Nathalie KARAM et Rita FREM. Je voudrais vous adresser un GRAND merci pour tout soutien pendant mes périodes de doute et pour vos multiples encouragements répétés. Vous m'avez permis d'avoir le cœur léger et l'esprit tranquille tout au long de ma thèse.

Enfin, j'adresse toute mon affection à ma famille, en particulier à ma mère, Antoinette, mon père, Antoine, mon frère, Jonathan et ma sœur, Danielle. Je vous remercie d'avoir cru en moi. Il n'aurait jamais été possible d'atteindre mes objectifs sans votre soutien financier et moral !

RESUMÉ

Les récepteurs cellulaires membranaires se divisent normalement en deux grandes familles selon leur capacité d'induction des voies de signalisation. La première famille est constituée par les récepteurs classiques qui induisent une signalisation positive qui active une voie de signalisation sous-jacente en présence de leur ligand et qui sont inactifs en absence du ligand. La deuxième famille de récepteurs cellulaires membranaires récemment décrite, à laquelle nous nous intéressons dans les travaux de cette thèse, sont les récepteurs à dépendance qui se comportent différemment : en présence de leurs ligands, ces récepteurs induisent une voie de signalisation « positive », favorisant la survie et la prolifération cellulaire tandis qu'en l'absence de leur ligand, ils induisent une voie de signalisation « négative » menant à l'activation de l'apoptose par l'activation extrinsèque des caspases.

L'objectif principal des travaux de cette thèse est d'explorer le rôle des récepteurs à dépendance dans les hémopathies malignes et d'évaluer l'effet de leur ciblage par des anticorps ciblant la nétrine ou l'ectodysplasine.

Dans un premier lieu, nous avons criblé différents types d'hémopathies malignes pour l'expression de la nétrine-1 et de ses récepteurs à dépendance, DCC et UNC5B, afin de déterminer les lignées cellulaires potentielles pour le ciblage de la nétrine-1 par un anticorps anti-nétrine-1 humanisé. Selon les résultats de ce criblage, les lymphomes non-hodgkiniens (LNH) à cellules du manteau et les myélomes multiples (MM) paraissent être les principales hémopathies cibles pour des traitements ciblant la nétrine-1. Quant aux myélomes multiples, des données de criblage de la nétrine-1 et de ses récepteurs obtenus sur des échantillons de patients semblent montrer une surexpression de ces protéines chez les patients atteints de cette maladie. Le ciblage de la nétrine-1 dans ce type d'hémopathies réduisait la viabilité cellulaire d'un modèle cellulaire de myélome multiple dans le cadre d'une combinaison du NP137 avec un inhibiteur de protéasome, le bortézomib. *In vivo* le traitement par NP137 des souris porteuses de xéno greffes de lignées de myélomes multiples humains ne réduit la croissance tumorale significativement par rapport aux souris non-traitées que lorsqu'il est combiné à la dexaméthasone. Par ailleurs l'exposition *ex vivo* au NP137 des échantillons frais de MM provenant des patients, était associé à une réduction du pourcentage des plasmocytes tumoraux chez certains patients.

Dans la deuxième partie de la thèse nous nous sommes intéressés à l'évaluation de l'ectodysplasine A1 (EdaA1) et son récepteur à dépendance EDAR dans les leucémies aiguës myéloïdes (LAM), suite à des données du TCGA qui suggèrent une surexpression de ce couple dans ce type d'hémopathie. Nos résultats de criblage montrent à la fois une surexpression de ces molécules dans 3 modèles cellulaires de LAM et suggèrent une surexpression de EdaA1 et d'EDAR dans une cohorte de 220 patients de LAM. *In vitro*, l'exposition à un anticorps anti-EdaA1 (NP604) des modèles cellulaires n'impactait pas leur viabilité en monothérapie mais induisait l'apoptose en combinaison avec un inhibiteur de c-FLIP, le lupéol, suggérant un rôle de cette protéine dans la résistance de ce type d'hémopathies au traitement. L'analyse de l'expression et du clivage de c-FLIP et de la caspase-8 dans les lignées de LAM traitées par le lupéol montrant un clivage de ces deux protéines après traitement suggère que le lupéol impacte l'interaction du domaine de mort d'EDAR avec c-FLIP et caspase-8 d'une manière similaire à ce qui se passe dans le cas des récepteurs de mort. Ces résultats exigent une confirmation à travers l'étude des interactions de ces protéines entre elles.

Si ces données sont confirmées, le ciblage de la signalisation des récepteurs à dépendance pourrait être envisagé dans ces deux types de cancers.

ABSTRACT

Cellular receptors are normally divided into two large families according to their ability to induce signaling pathways. The first family includes the classic receptors which work as an on/off switch that induces a positive signaling pathway in the presence of their ligand and which are deactivated in the absence of the ligand. The second family, in which we are interested in this thesis, is a recently described cell membrane receptors called dependence receptors which are always active; in the presence of their ligand, these receptors induce a “positive” signaling pathway often leading to cell survival, whereas in the absence of their ligand, they induce a “negative” signaling pathway often leading to apoptosis by extrinsic activation of caspases.

The main objective of the work of this thesis is to explore the role of dependence receptors in hematological malignancies and to assess the effect of their targeting using anti-netrin-1 and anti-ectodysplasin antibodies.

First, we screened different types of hematological malignancies for the expression of netrin-1 and its dependence receptors, DCC and UNC5B, in order to determine the potential cell lines for netrin-1 targeting by a proposed humanized anti-netrin-1 antibody. According to these screenings, mantle cell lymphoma non-Hodgkin's lymphomas (NHL) and multiple myelomas (MM) appear to be the main target malignancies for anti-netrin-1 treatment (NP137). NP137 appears to be effective against NHL by targeting netrin-1 both secreted in a paracrine and / or autocrine fashion in an established co-culture model. In addition, in an NHL model, netrin-1 seems to accelerate cell proliferation evaluated by the CFSE test. As for multiple myelomas, screening data for netrin-1 and its receptors obtained from patient samples seem to show an overexpression of these proteins in patients suffering from this disease. Targeting netrin-1 in this type of hematological malignancies reduced the cell viability of a multiple myeloma cell model when combining it with a proteasome inhibitor, bortezomib. In vivo treatment with NP137 of mice grafted with ectopic xenografts of multiple human myelomas significantly reduced tumor growth compared to untreated mice only when it was combined with dexamethasone. Furthermore, ex vivo exposure to NP137 of fresh MM samples from patients was associated with a reduction in the percentage of tumor plasma cells in some patients.

In the second part of the thesis, we will focus on the evaluation of the targeting and prognostic value of ectodysplasin A1 (EdaA1) and its dependence receptor EDAR in acute myeloid leukemia (AML) following TCGA data which suggest an overexpression of this couple in this type of hematological malignancies. Our screening results show both overexpression of this couple in 3 AML cell models and suggest overexpression of EdaA1 and EDAR in a cohort of 220 AML patients. In vitro, the exposure to the proposed anti-EdaA1 antibody (NP604) of cell models does not affect their viability in monotherapy but induced apoptosis when combined with a c-FLIP inhibitor, lupeol, suggesting a role for this protein in the resistance of this type of malignancies to the proposed treatment. Analysis of the expression and the cleavage of c-FLIP and caspase-8 in the AML lines treated with lupeol showing a cleavage of these two proteins after treatment suggests that lupeol impacts the interaction of the death domain of EDAR with c-FLIP and caspase-8 in a similar way to what happens in the case of death receptors. These results require confirmation by studying the interactions of these proteins with each other.

If these data are confirmed, targeting the signaling pathways of dependence receptors could be considered in these two types of cancer.

Sommaire

Liste des figures	6
Liste des tableaux.....	6
Liste des abréviations.....	7
INTRODUCTION	10
<i>Chapitre I : Les Lymphomes Non-Hodgkiniens</i>	<i>11</i>
1.1. Définition et facteurs de risque	11
1.2. Epidémiologie	12
1.3. Physiopathologie.....	13
1.4. Diagnostic.....	14
1.4.1. Dépistage	14
1.4.2. Classification	14
1.4.3. Stadification	15
1.5. Traitement	16
1.5.1. Les traitements conventionnels du lymphome non Hodgkinien	16
a- La Chimiothérapie	16
b- La radiothérapie	17
1.5.2. Petites molécules inhibitrices ciblées.....	18
a- Inhibiteurs de la signalisation par BCR.....	18
b- Inhibiteurs de Bcl-2.....	19
1.5.3. Immunothérapie	20
a- Anticorps monoclonaux.....	20
b- Cytokines	21
c- Thérapie adoptive par cellules T	21
<i>Chapitre II : Le Myélome Multiple</i>	<i>24</i>
2.1. Définition et facteurs de risque	24
2.2. Epidémiologie	24
2.3. Physiopathologie.....	25
2.4. Diagnostic.....	26
2.4.1. Dépistage	26
2.4.2. Cyto et Histopathologie.....	28
2.4.3. Classification.....	29
a- Myélome symptomatique	29
b- Myélome asymptomatique	29
c- MGUS	30
2.4.4. Stadification	30
a- Stadification de Salmon et Durie	30
b- Système International de Stadification (ISS).....	31
2.5. Traitement	32
2.5.1. Les traitements conventionnels du myélome	32
2.5.2. Nouvelles approches thérapeutiques.....	34
2.5.3. Thérapie ciblée et immunothérapie	36
2.5.4. Evaluation de la réponse au traitement	37
<i>Chapitre III : Leucémie Aiguë Myéloïde.</i>	<i>40</i>
3.1. Définition et facteurs de risque	40
3.2. Epidémiologie	40
3.3. Physiopathologie.....	42

3.4.	Diagnostic.....	43
3.4.1.	Dépistage	43
3.4.2.	Classification.....	43
a-	Classification « Franco-Américano-Britannique » (FAB).....	44
b-	Classification de l’OMS « World Health Organization classification »	45
3.5.	Traitement	47
3.5.1.	Traitements conventionnels par chimiothérapie.	47
a-	Phase d’induction.....	48
b-	Phase de consolidation	49
3.5.2.	Thérapies ciblées.....	50
<i>Chapitre IV : Récepteurs à Dépendance</i>		<i>53</i>
4.1.	Les récepteurs à la nétrine-1 : DCC et la famille des UNC5.....	54
4.1.1.	Les nétrines	55
a-	La famille des nétrines.....	55
b-	Structure des nétrines.....	56
c-	Expression de la nétrine-1 au cours du développement et chez l’adulte	57
4.1.2.	Les récepteurs à dépendance de la nétrine-1 : DCC et UNC5	60
a-	DCC : structure et expression.....	60
b-	UNC5 : structure et expression.....	62
4.1.3.	Signalisation des récepteurs DCC et UNC5 en présence de nétrine-1	65
a-	Signalisation induite par DCC.....	65
b-	Signalisation induite par UNC5.....	69
4.1.4.	Signalisation de DCC et de UNC5 en absence de la nétrine-1 : récepteurs à dépendance. 72	
a-	Induction d’apoptose via DCC.....	72
b-	Induction d’apoptose via UNC5.....	75
4.1.5.	Expression et rôle de nétrine-1 et ses récepteurs dans les cancers.	77
a-	Régulation de l’expression de la nétrine-1 dans les cancers.....	78
b-	Rôle de DCC dans la carcinogenèse et la progression tumorale	80
c-	Rôle de UNC5 dans la carcinogenèse et la progression tumorale	82
4.1.6.	Ciblage thérapeutique de la nétrine-1.....	84
4.2.	Ectodysplasine A1 et son récepteur EDAR.....	85
4.2.1.	Structure.....	85
a-	Ectodysplasine	85
b-	Récepteurs à Ectodysplasine EDAR and XEDAR	87
4.2.2.	Expression et rôle durant le développement et dans les tissus.....	88
4.2.3.	Différentes voies de signalisation induites et influencées par EDAR	90
a-	Voie canonique de NF-κB.....	90
b-	Influence sur la voie Wnt	94
4.2.4.	Induction de l’apoptose par les TNF : EDAR récepteur à dépendance.....	95
4.2.5.	c-FLIP : régulateur anti-apoptotique	98
a-	Structure.....	98
b-	Surexpression dans les cancers humains.....	99
c-	Rôle de c-FLIP dans la prévention de l’apoptose et le maintien de l’homéostasie	100
d-	Ciblage thérapeutique de c-FLIP dans les cancers.	101
4.2.6.	EDA/EDAR et cancers	103
<i>Objectifs de la thèse</i>		<i>105</i>
<i>Résultats</i>		<i>108</i>
<i>Chapitre I : Expression de la nétrine-1 dans les hémopathies et exploration de son rôle dans le Lymphome non-hodgkinien.....</i>		<i>109</i>

<i>Chapitre II : Expression et ciblage de la nétrine-1 dans le myélome multiple.</i>	138
<i>Chapitre III : Évaluation de la valeur pronostique et de l'effet du ciblage de EDAA1/EDAR dans les Leucémies Aigües Myéloïdes.</i>	159
<i>Discussion Générale</i>	198
<i>Perspectives.....</i>	205
<i>Références bibliographiques</i>	213

Liste des figures

Figure 1 : origine cellulaire des différentes hémopathies.	23
Figure 2 : électrophorèses des protéines provenant du sérum d'un individu sain (graphe bleu) et d'un individu atteint de myélome multiple (graphe vert) montrant un pic de paraprotéine (anticorps monoclonal).	27
Figure 3 : illustration de quelques ligands et récepteurs à dépendance	54
Figure 4 : structure de la famille des nétrines.	57
Figure 5 : signalisation positive de DCC en présence de nétrine-1.	68
Figure 6 : induction de l'apoptose par le récepteur DCC.....	71
Figure 7 : signalisation du récepteur UNC5B.....	74
Figure 8 : modèle de signalisation du récepteur EDAR. (Morlon et al. 2006)	93
Figure 9 : modèle d'induction de l'apoptose par EDAR. (Adapté de Vial et al. 2019)	98
Figure 10 : modèle de co-culture pour le ciblage autocrine et paracrine de la nétrine-1 dans le modèle cellulaire Granta-519 de lymphome non-hodgkinien.....	122
Figure 11 : expression de la nétrine-1 et ses récepteurs DCC et UNC5B dans les hémopathies malignes.	129
Figure 12 : évaluation de l'effet de NP137 (anti-nétrine-1) sur la viabilité des cellules d'une lignée de LNH (Granta-519) par cytométrie en flux après marquage à l'annexinV/IP en système de coculture.....	130
Figure 13 : évaluation de l'effet de l'anti-nétrine-1 sur la croissance tumorale de Granta-519 dans un modèle préclinique. Les souris sont divisées en deux groupes (4souris/groupe) ; groupe non-traité et groupe traité par NP137.	131
Figure 14 : évaluation de l'effet de la surexpression de la nétrine-1 dans des modèles cellulaires de lymphome (Granta-519 et RL)	135

Liste des tableaux

Tableau 1 : extrait de la cinquième édition de la classification de l'Organisation mondiale de la santé (OMS) des tumeurs des tissus hémoïétiques et lymphoïdes.	15
Tableau 2 : système de stadification de Ann Arbor des lymphomes non-hodgkiniens. Un E est ajouté aux stades I, II ou III, s'il y a une atteinte viscérale contiguë.	16
Tableau 3 : agents chimiothérapeutiques utilisés pour le traitement des hémopathies B.....	17
Tableau 4: classification FAB (franco-américano-britannique) des AML.	45
Tableau 5 : classification des AML selon l'OMS.....	46
Tableau 6 : détails de la RT-qPCR pour détecter l'expression des gènes nétrine-1, DCC et UNC5B.....	114

Liste des abréviations

Akt	Protein kinase B
AMM	Association for Accessible Medicines
AMPc	Cyclic adenosine monophosphate
ANAE	alpha-naphtyl acétate estérase
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
Apc	Adenomatous polyposis coli
ARN	Acide RiboNucléique
Ask1	Apoptosis signal-regulating kinase 1
Bcl2	B-cell lymphoma 2
BCMA	B-cell maturation antigen
BCR	B cell receptor
BiTE	Bi-specific T-cell engagers
BMSCs	Bone marrow-derived stromal cells
BTK	Bruton's tyrosine kinase
CD	cluster of differentiation
Cdc42	Cell division control protein 42 homolog
CEBPA	CCAAT/enhancer-binding protein alpha
c-FLIP	Cellular FLICE (FADD-like IL-1 β converting enzyme)-inhibitory protein
DAPK1	Death-associated protein kinase 1
DCC	Deleted in Colorectal Cancer
DD	Death domain
DIP13	13 kDa deflagellation-inducible protein
Dkk1	Dickkopf-related protein 1
DLBCL	Diffuse large B-cell lymphoma
DNMT3	DNA methyltransferase 3
DNR	Daunorubicin
Dox	Doxorubicin
DSCAM	Down syndrome cell adhesion molecule
EDA	Ectodysplasin
EDAR	Ectodysplasin Receptor
EDARADD	Ectodysplasin Receptor Associated Death Domain
EPI	Epirubicin
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
FADD	Fas Associated Death Domain
FAK	Focal adhesion kinase
FDA	Food and Drug Administration
FES	Feline sarcoma oncogene
FL	Follicular Lymphoma
FLT3	fms like tyrosine kinase 3
Fn	Fibronectin
GATA1	GATA binding protein 1
GMPC	guanosine monophosphate cyclique
HDACi	Histone deacetylase inhibitor
HHV8	Human herpes virus 8

HOX	Homeobox genes
HTLV	Human T-cell lymphotropic virus type 1
IDA	Idarubicin
IFN	Interferon
Ig	Immunoglobulin
IL	Interleukin
IMiD	Immuno-modulatory Drug
IMWG	International Myeloma Working Group
IRM	imagerie par résonance magnétique
JNK	c-Jun N-terminal kinases
kit	tyrosine-protein kinase CD117
KMT2A	Histone-lysine N-methyltransferase 2A
KRAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
LAL	Leucémie aiguë lymphoblastique
LAM	Leucémie aiguë myéloïde
LDH	Lactate déshydrogénase
LLC	Leucémie lymphoïde chronique
LNH	Lymphome non hodgkinien
MAGE	Melanoma-associated antigen
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MCL	Myeloid cell leukemia
MEK	Mitogen-activated protein kinase
MGUS	Monoclonal gammopathy of undetermined significance
MM	Multiple Myeloma
MPO	Myeloperoxidase
MZL	Marginal zone lymphoma
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
Nck1	non-catalytic region of tyrosine kinase adaptor protein 1
NGS	Next-Generation Sequencing
NK	Natural killer
NP137	NetrisPharma 137
NP604	NetrisPharma 604
NPM1	Nucleophosmin 1
NRAGE	Neurotrophin receptor-interacting MAGE homolog
NRAS	Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog
N-Wasp	neural Wiskott-Aldrich syndrome protein
OBL	Osteoblast
OCL	Osteoclast
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
Pak1	p21-activated kinase 1
PC	plasmocyte
PD1	Programmed cell death protein 1
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
RAR	Retinoic Acid Receptor
ROS	Reactive Oxygen Species
SEER	Surveillance, Epidemiology, and End Results

SLAMF7	Signaling lymphocytic activation molecule Family 7
SN	Système nerveux
SNC	Système nerveux central
SODD	Silencer of death domain protein
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription protein
SYK	Spleen Associated Tyrosine Kinase
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TEB	Terminal end bud
TKR	Tyrosine Kinase Receptor
TNF	Tumor Necrosis Factor
TNFR	Tumor Necrosis Factor Receptor
TRADD	Tumor necrosis factor receptor type 1-associated DEATH domain protein
TSP	Thrombospondin
UNC	Uncoordinated
UPA	Unc-Pidd-Ankyrins
VASP	Vasodilator-stimulated phosphoprotein
VCAM	Vascular cell adhesion protein
VLA4	Very late antigen-4
WT1	Wilms tumor 1
XEDAR	X-linked ectodermal dysplasia receptor
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis protein
XLHED	X-Linked Hypohidrotic Ectodermal Dysplasia
Zo	Zona Occludens

INTRODUCTION

Chapitre I : Les Lymphomes Non-Hodgkiniens

1.1. Définition et facteurs de risque

Les lymphomes non-Hodgkinien (LNH) constituent un groupe d'hémopathies développées à partir des lymphocytes (Figure 1). Les LNH se développent principalement dans le système lymphatique, notamment dans les ganglions lymphatiques, mais peuvent toucher tous les organes. La majorité des LNH sont issus des lymphocytes B (80-85%) et le reste dérive des lymphocytes T et des NK[1]. Les LNH se distinguent des maladies de Hodgkin, dont la caractéristique histologique la plus spécifique est la présence de cellules de Reed-Sternberg, qui représentent environ 10% de l'ensemble des lymphomes.

Le développement des différentes formes de LNH est associé à plusieurs facteurs de risque, parmi lesquels on peut citer :

Les agents infectieux :

LNH [8]. Le risque est également élevé chez les individus souffrant d'une immunodéficience après une greffe d'organe sous traitement immuno-suppresseur [9].

Maladies génétiques comme le syndrome de Klinefelter, le syndrome de Chédiak – Higashi et le syndrome d'ataxie – télangiectasie[10], [11]

Maladies auto-immunes comme le syndrome de Sjögren, la maladie cœliaque, la polyarthrite rhumatoïde et le lupus érythémateux disséminé [12]

Exposition à certains toxiques comme les biphényles polychlorés (PCB)[13]–[15], et les dioxines.

Certains traitements médicaux comme la radiothérapie et la chimiothérapie.

1.2. Épidémiologie

Le lymphome non-hodgkinien est la septième forme de cancer la plus fréquemment diagnostiquée aux États-Unis, représentant 4,3% de tous les cancers, avec environ 74 200 nouveaux cas (19,6 pour 100 000) en 2019. Le LNH est également la huitième cause de décès par cancer aux États-Unis, avec environ 5,6 pour 100 000 en 2019. Le nombre total des décès était estimé à 19 970 en 2019 [16]. Environ 2,2% des hommes et des femmes auront un diagnostic de LNH à un moment donné au cours de leur vie. Selon les données du SEER, l'âge médian au diagnostic du LNH est de 67 ans.

Au cours des 20 dernières années, l'incidence du lymphome non hodgkinien a augmenté régulièrement dans tous les groupes d'âge et chez les deux sexes, de 3 à 5% par an [17]. La raison de cette augmentation n'est pas claire, bien que l'augmentation de l'âge de la population exposée entraîne une augmentation supplémentaire du nombre total absolu de patients atteints de LNH [17], [18].

1.3. Physiopathologie

La plupart des tumeurs malignes lymphoïdes dérivent des lymphocytes à différents stades de différenciation. Il existe deux types de tissus lymphoïdes : primaires (moelle osseuse et thymus) et secondaires (sang, rate, ganglion lymphatique et muqueuses). Pour comprendre les mécanismes de développement des lymphomes, les événements qui surviennent pendant la maturation normale des lymphocytes doivent être considérés.

Au cours du développement normal des lymphocytes B, les cellules proviennent des tissus lymphoïdes centraux où les précurseurs des lymphocytes B subissent un réarrangement des chaînes lourdes et légères des immunoglobulines (Ig) et l'expression d'un récepteur d'antigène de surface fonctionnel, le B cell receptor (BCR). Ce réarrangement est rendu possible par des enzymes qui provoquent des ruptures dans les doubles brins ADN [19]. Malgré les processus de réparation de l'ADN dans les cellules, certaines subissent des translocations chromosomiques suite à ces cassures chromosomiques, ce qui aboutit à une activation du proto-oncogène dans le lymphome [20]–[22].

Les descendants de ces cellules précurseurs, appelées cellules B naïves, migrent dans les tissus lymphoïdes périphériques. Les cellules B naïves subissent une expansion clonale dans les centres germinatifs, qui se trouvent dans le cortex des ganglions lymphatiques [23]. Dans le centre germinatif des ganglions lymphatiques, les gènes des immunoglobulines seront encore modifiés par l'hyper mutation somatique, un processus par lequel les cellules subissent des mutations et des recombinaisons [24].

1.4.Diagnostic

1.4.1. Dépistage

Les symptômes du LNH peuvent être divisés en deux parties, toutes les deux nécessaires pour bien diagnostiquer la maladie : les symptômes généraux et les symptômes reliés à la localisation initiale du LNH. Les symptômes généraux comprennent de la fièvre qui ne peut pas être expliquée par une infection ou une autre maladie, la perte de poids sans cause connue, la transpiration excessive, la fatigue. Plusieurs territoires lymphoïdes peuvent être atteints, sus- ou sous-diaphragmatiques, comprenant les ganglions lymphatiques mais aussi les autres tissus lymphatiques.

Plusieurs examens complémentaires vont être réalisés pour préciser la nature et l'extension de la maladie :

édition de la classification de l'Organisation mondiale de la santé (OMS) des tumeurs des tissus hématopoïétiques et lymphoïdes, publiée en 2016 (tableau 1)[25]. Plus de 70 sous-types spécifiques de LNH ont été identifiés par l'OMS. Les sous-types de LNH sont classés par les caractéristiques des cellules de lymphome, y compris leur morphologie, la présence de protéines à la surface des cellules et leurs caractéristiques génétiques[25], [26].

Sous type de LNH	Epidémiologie	Anomalie génétique
Lymphome Folliculaire	20-30% des LNH adultes	Bcl-2
Lymphome de la zone marginale	9% des LNH adultes	Myd88
Lymphome à cellules du manteau	5-10% des LNH adultes	Bcl-1, cyclin D1
Lymphome diffus à grandes cellules B	30-40% des LNH adultes	Bcl-2 (15-30%), Bcl-6 (20-40%), c-myc (5-15%)
Lymphome de Burkitt	1% des LNH adultes	c-myc, Bcl-6
Lymphome à cellules T	5-10% des LNH adultes	Tet2, Dnmt3A, Irf2, RhoA, CD28

Tableau 1 : extrait de la cinquième édition de la classification de l'Organisation mondiale de la santé (OMS) des tumeurs des tissus hématopoïétiques et lymphoïdes.

Les sous-types de LNH sont également caractérisés en fonction de la progression de la maladie[27], [28]:

prend en compte la localisation des adénopathies et des autres atteintes afin de déterminer le stade de la maladie. Les principaux stades figurent dans le tableau 2.

Critère	
I	Atteinte d'une seule aire ganglionnaire.
II	Atteinte de deux régions ganglionnaires ou plus du même côté du diaphragme.
III	Atteinte d'aires ganglionnaires des deux côtés du diaphragme
IV	Atteinte(s) extranodale(s)

Tableau 2 : système de stadification de Ann Arbor des lymphomes non-hodgkiniens. Un E est ajouté aux stades I, II ou III, s'il y a une atteinte viscérale contiguë.

1.5. Traitement

1.5.1. Les traitements conventionnels du lymphome non Hodgkinien

a- La Chimiothérapie

La chimiothérapie cytotoxique est un traitement systémique qui utilise des médicaments pour arrêter la croissance des cellules cancéreuses, entraînant la mort cellulaire. La chimiothérapie est administrée à plusieurs reprises (cycles) et peut être administrée par voie orale, par injection ou par perfusion[31]. La poly chimiothérapie reste aujourd'hui un traitement essentiel pour les LNH. Il s'agit d'une combinaison de différentes drogues pour maximiser la destruction des cellules tout en minimisant la toxicité qui se chevauchent. Le schéma de chimiothérapie utilisé dépend du stade et du type de LNH. La combinaison de chimiothérapie la plus courante pour le traitement initial du LNH agressif est appelée CHOP et contient quatre médicaments: le cyclophosphamide, l'hydroxy-daunomycine (doxorubicine), l'Oncovin® (vincristine) et la prednisone [32]. Il existe également d'autres combinaisons courantes de chimiothérapie, notamment : bendamustine, fludarabine, cyclophosphamide, étoposide, composés du platine. Des exemples de molécules chimiothérapeutiques couramment utilisées pour le traitement du LNH sont répertoriés dans le tableau 3 en fonction de leurs mécanismes d'action.

Mécanisme d'action		Exemple
Modification de la structure de l'ADN	Formation de liaisons covalentes avec l'ADN	Agents alkylants : cyclophosphamide ifosfamide bendamustine
	Coupure de l'ADN	Bléomycine
	Agents intercalants	Anthracyclines doxorubicine daunorubicine
Anti-métabolites	Inhibition de la synthèse des acides nucléiques	fludarabine cladribine gemcitabine Cytarabine gemcitabine méthotrexate
Agents anti tubuline	Perturbation des fuseaux mitotiques	Alcaloïdes de Vinca Vincristine Vinblastine Vinorelbine

Tableau 3 : agents chimiothérapeutiques utilisés pour le traitement des hémopathies B

b- La radiothérapie

La radiothérapie consiste à utiliser des rayons X à haute énergie, des électrons ou des protons pour détruire les cellules cancéreuses. Un régime de radiothérapie consiste généralement en un nombre spécifique de traitements administrés sur une période de temps définie et sur un territoire précis du patient. Il est généralement administré après ou en plus de la chimiothérapie, selon le sous-type de LNH. Il est le plus souvent administré aux patients atteints d'un lymphome localisé, ce qui signifie qu'il n'implique que 1 ou 2 zones adjacentes, ou les patients ayant un ganglion lymphatique particulièrement volumineux. Il peut également être administré pour le traitement de la douleur ou à très faible dose (seulement 2 traitements) aux patients atteints d'une maladie avancée qui présentent des symptômes localisés qui peuvent être soulagés par la

radiothérapie. Cependant, le rôle de la radiothérapie continue d'être largement discuté ; l'interprétation étant compliquée par les différentes populations d'essais, les méthodes d'évaluation du risque, ainsi que par les différences de la fréquence du traitement et de dose de rayonnement[33].

1.5.2. Petites molécules inhibitrices ciblées

Au cours des dernières années, il y a eu une augmentation du nombre de petites molécules ciblées entrant dans le développement clinique ou approuvées dans les lymphomes. Les inhibiteurs de petites molécules interrompent généralement les processus cellulaires en interférant avec la signalisation intracellulaire d'enzymes spécifiques. Ces enzymes déclenchent une cascade moléculaire qui peut entraîner la croissance, la prolifération, la migration et l'angiogenèse cellulaires dans les tissus normaux et malins[34], [35]. La plupart de ces molécules ciblent la signalisation par le récepteur spécifique des lymphocytes B (BCR) tels que les inhibiteurs de la tyrosine kinase de Bruton, les inhibiteurs de la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) et les inhibiteurs de la tyrosine kinase de la rate (spleen tyrosine kinase SYK) alors que d'autres ciblent le Bcl-2.

a- Inhibiteurs de la signalisation par BCR

La tyrosine kinase de Bruton (BTK) est impliqué dans de multiples voies de transduction de signaux régulant la survie, l'activation, la prolifération et la différenciation des cellules lymphoïdes de lignée B[36], [37]. Des inhibiteurs covalents et non covalents de la BTK sont développés en tant qu'agents thérapeutiques pour diverses indications. L'inhibition de la BTK a été associée à une réduction de la migration, de la prolifération et de la survie des cellules[38]–[41]. L'ibrutinib, un inhibiteur de BTK le plus développé a démontré une tolérabilité et une activité impressionnante dans une gamme de lymphomes à cellules B. Il s'agit d'une petite molécule disponible par voie orale qui agit comme un inhibiteur irréversible de la BTK en se liant à l'acide aminé cystéine-481, près du site actif. L'ibrutinib est actuellement approuvé par

la Food and Drug Administration des États-Unis (FDA) pour la LLC non traitée et en rechute, le lymphome à cellules du manteau en rechute (MCL), la macroglobulinémie de Waldenstrom et le lymphome de la zone marginale (MZL)[37], [42].

La PI3K est une autre kinase qui est activée suite à l'activation de la voie du BCR. Elle active ensuite AKT et mTOR pour favoriser la prolifération et la survie des cellules malignes. La déréglementation de cette voie a été associée à plusieurs types de LNH[43]–[45]. Plusieurs études ont montré que le ciblage de PI3K dans les lymphomes à cellules du manteau ralentit la progression de la tumeur[46]–[48]. De plus, l'isoforme PI3K δ est fortement exprimée dans les cellules CLL. L'idelalisib est un puissant inhibiteur oral du PI3K δ , actuellement approuvé pour une utilisation dans les cas de FL et CLL réfractaires[49], [50]. Il est utilisé en monothérapie ou en association avec d'autres agents chimiothérapeutiques ou des anticorps monoclonaux. Néanmoins une toxicité importante limite actuellement son utilisation[51]. Les inhibiteurs de PI3K de deuxième génération comprennent ceux en cours de développement comme le TGR-1202 ou approuvés comme le duvelisib et le copanlisib [35], [52], [53].

La tyrosine kinase de la rate SYK est essentielle au développement et à la prolifération des lymphocytes B et des études récentes ont montré l'implication de cette protéine dans la pathogenèse du LNH[54], [55]. L'inhibition de la SYK par des inhibiteurs ciblés de petites molécules entraîne une diminution de l'activité mTOR dans le MCL, le lymphome de Burkitt et le CLL[56]. Le fostamatinib, un inhibiteur compétitif de SYK, est en cours d'évaluation dans le traitement des lymphomes.

b- Inhibiteurs de Bcl-2

Bcl-2 est un régulateur apoptotique clé et joue un rôle important dans la survie de cellules lymphoïdes normales et malignes [57]–[59]. La famille comprend les protéines de pro-survie

et pro-apoptotiques [60]–[62]. Dans les cellules lymphoïdes malignes, leur équilibre passe à la pro-survie permettant à ces cellules d'échapper à l'apoptose[63]–[65]. Le vénétoclax (ABT-199) est un inhibiteur de BCL-2 de deuxième génération qui est à la fois puissant et hautement sélectif [66], [67].

1.5.3. Immunothérapie

L'immunothérapie anti tumorale est un traitement qui vise à mettre en jeu le système immunitaire pour pouvoir lutter contre le cancer. Certains types d'immunothérapie ne ciblent que certains types cellulaires ou protéine précise, tandis que d'autres affectent le système immunitaire de manière générale. Plusieurs types différents d'immunothérapies ont été évaluées chez les patients porteurs de syndromes lymphoprolifératifs : anticorps monoclonaux ciblant des molécules membranaires, inhibiteurs de points de contrôle du système immunitaire, cytokines, thérapie par lymphocytes T à récepteur d'antigène chimérique (CAR) et vaccins.

a- Anticorps monoclonaux

La thérapie par anticorps monoclonaux a également été appelée immunothérapie passive par opposition à immunothérapie adoptive (telle que celle représentée par la perfusion de cellules immunitaires). Le rituximab a été le premier anticorps monoclonal (mAb) développé à des fins thérapeutiques. Il cible la molécule CD20, une protéine membranaire trouvée à la surface de toutes les cellules B matures qui ont généralement une expression constitutive et constante et fournit donc une excellente cible thérapeutique. Le rituximab a représenté une avancée thérapeutique majeure contre cette maladie, en particulier pour le traitement des formes indolentes et agressives de LNH et de LLC à cellules B [68]–[70]. Après le rituximab, plusieurs autres anti-CD20mAbs ont été développés et approuvés par la FDA pour le traitement des tumeurs malignes à cellules B, dont le tositumomab, l'ofatumomab, l'ibritumomab et l'obinutuzumab [71]–[77]. En plus des mAb anti-CD20, d'autres anticorps dirigés contre d'autres antigènes de surface tels que CD22 (epratuzumab), CD23 (lumiliximab) et anti CD80

(galiximab) et CD79b ont été développés [78]–[81]. Une autre approche très intéressante est l'application du blinatumomab, un anticorps bispécifique engageant les cellules T (BiTE), qui cible à la fois les antigènes CD19 et CD3. Bien que le blinatumomab soit actuellement utilisé uniquement pour le traitement de la leucémie lymphoblastique aiguë [82]–[85], des résultats prometteurs ont également été obtenus dans les lymphomes à cellules B, où le blinatumomab était utilisé en monothérapie [86], [87]. Finalement, des études ont également montré l'efficacité du ciblage de PD-1 par le nivolumab et le pidilizumab pour traiter les lymphomes folliculaires ainsi que des cas de lymphome diffus à grandes cellules B mais ces traitements restent plus efficaces dans le cas des lymphomes hodgkinien. [88]–[90]

b- Cytokines

Les cytokines les plus couramment utilisées sont les interférons (IFN)[91]–[94]. L'interféron alpha (IFN- α) est une cytokine produite par les leucocytes pour aider le système immunitaire à combattre les infections. L'IFN- α recombinant a montré une activité cytotoxique contre les tumeurs malignes des cellules B en activant la signalisation IFN- α R dans les cellules B et induisant ainsi l'apoptose, inhibant la prolifération et la progression du cycle cellulaire[95]–[98]. Bien que l'IFN- α démontre une bonne activité anti-tumorale, sa toxicité systémique importante réduit l'index thérapeutique.

c- Thérapie adoptive par cellules T

Le récepteur antigénique chimérique (CAR) est une protéine immunogène synthétique qui reconnaît et cible une protéine présente à la surface de cellules tumorales. Ce CAR est exprimé par des lymphocytes T autologues (càd venant du patient lui-même) après leur modification génétique. Ces lymphocytes exprimant le CAR sont appelés lymphocytes T à récepteur antigénique chimérique (CAR-T). Ils sont ensuite réinjectés chez le patient et vont pouvoir s'amplifier et attaquer les cellules qui seront reconnues par le CAR [99], [100]. Les cellules

CAR-T peuvent exprimer une ou plusieurs molécules co-stimulantes, telles que CD28, OX40 ou CD137 [101]–[103].

Des résultats cliniques remarquables ont été obtenus dans des hémopathies malignes B, en particulier des DLBCL et CLL traités avec des cellules CAR-T avec une spécificité pour le CD19 [104]–[107]. Les infusions de cellules CAR-T-anti-CD19 autologues ont montré une éradication complète des cellules B du sang et de la moelle osseuse chez certains patients pendant des périodes prolongées, démontrant leur puissante activité biologique [108], [109].

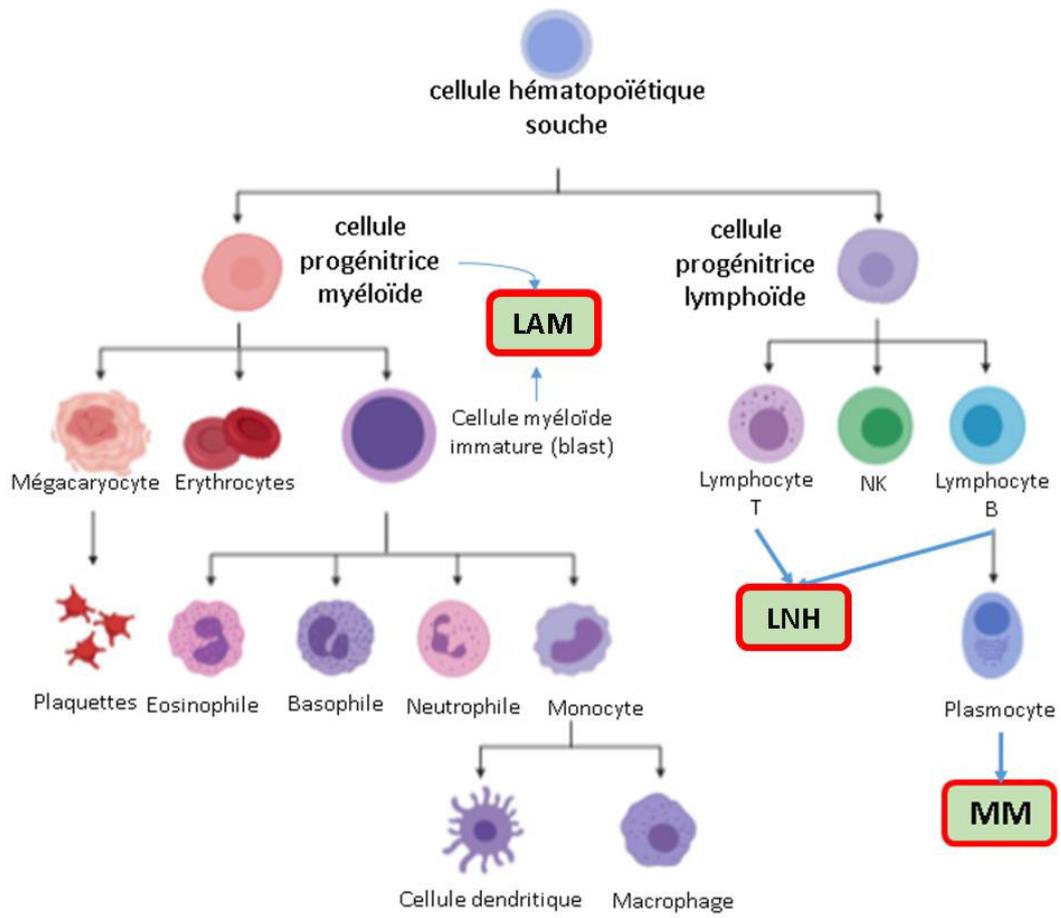


Figure 1 : origine cellulaire des différentes hémopathies.

Les lymphomes non-Hodgkinien (LNH) constituent un groupe d'hémopathies développées à partir des lymphocytes. Les LNH se développent principalement dans le système lymphatique, notamment dans les ganglions lymphatiques, mais peuvent toucher tous les organes.

Le myélome multiple (MM) ou maladie de Kahler est une maladie de la moelle osseuse. C'est un cancer qui touche les plasmocytes, qui produisent normalement les anticorps [110] Il se caractérise par la croissance incontrôlée de plasmocytes clonaux (PC) et conduit à la production de gammaglobulines en excès.

La leucémie aiguë myéloïde (LAM) est une hémopathie développée à partir des cellules progénitrices des lignées myéloïdes. Cette néoplasie est caractérisée par la croissance rapide anormale des cellules immatures et un défaut de différenciation, avec un retentissement important sur l'hématopoïèse normale.

Chapitre II : Le Myélome Multiple

2.1. Définition et facteurs de risque

Le myélome multiple (MM) ou maladie de Kahler est une maladie de la moelle osseuse. C'est un cancer qui touche les plasmocytes, qui produisent normalement les anticorps [110]. Il se caractérise par la croissance incontrôlée de plasmocytes clonaux (PC) et conduit à la production de gammaglobulines en excès (Figure 1). Ces anticorps anormaux produits par les cellules cancéreuses peuvent être à l'origine d'une insuffisance rénale ou d'un syndrome d'hyperviscosité. Les plasmocytes peuvent également former une masse dans la moelle osseuse ou les tissus mous. Les caractéristiques cliniques du myélome multiple peuvent inclure une perte de la fonction normale de la moelle osseuse, une structure osseuse défectueuse et une insuffisance rénale.

Chez certains patients cette maladie ne présente aucun symptôme au départ. Au fur et à mesure de sa progression, des douleurs osseuses, des saignements, des infections fréquentes et une anémie peuvent survenir ainsi que des complications comme l'amylose.

D'après l'organisation mondiale de santé, la cause du myélome multiple est inconnue. Les facteurs de risque comprennent l'exposition aux radiations, les antécédents familiaux. Le myélome multiple se développe après une phase de gammopathie monoclonale de signification indéterminée (MGUS) caractérisée aussi par la production des anticorps anormaux mais de façon plus faible, souvent asymptomatique, mais détectable par des tests sanguins au laboratoire, qui évolue parfois vers un myélome multiple maligne[111].

2.2. Epidémiologie

Des études statistiques menées par l'institut national du cancer aux États-Unis sous le programme SEER (Surveillance, Epidemiology, and End Results) ont montré que le myélome multiple est le deuxième cancer du sang le plus fréquent après le lymphome non hodgkinien

aux États-Unis. En 2019, 32110 adultes (18 130 hommes et 13 980 femmes) ont été diagnostiqués aux États-Unis. Le nombre de décès en 2019 à cause du MM a été estimé à 12 960 (6 990 hommes et 5 970 femmes)[112]. À l'échelle mondiale, le myélome multiple a touché 488 000 personnes et a causé 101 100 décès en 2015[113], [114].

L'âge médian de survenue du myélome multiple se situe entre 65 et 70 ans et il est plus fréquent chez les hommes que chez les femmes avec un sexe ratio entre 1,1 et 1,3 [110], [115]. Il est rare avant l'âge de 40 ans[110]. Sans traitement, la survie typique est de sept mois [116].

2.3. Physiopathologie

Le myélome multiple (MM) est une maladie qui se développe dans la moelle osseuse. Ceci signifie que les différents types de cellules osseuses sont présentes dans le microenvironnement des cellules plasmocytaires cancéreuses, en particulier les ostéoblastes (OBL) et les ostéoclastes (OCL). Ces dernières peuvent interagir avec les plasmocytes cancéreux par le biais de différentes cytokines qu'ils secrètent. Un déséquilibre dans l'activité des OBL et des OCL entraîne un remodelage de la structure osseuse en augmentant la résorption et diminuant la synthèse du tissu osseux[117], [118].

Les lésions osseuses observées dans le myélome multiple sont principalement causées par les ostéoclastes plutôt que par les cellules tumorales plasmocytaires[119]. Des études ont montré que les OCL s'accumulent uniquement sur les surfaces de résorption osseuse adjacentes aux cellules de MM. En effet, les cellules du MM adhèrent aux cellules du stroma de la moelle osseuse (BMSCs) par l'interaction de VLA-4 exprimés par les plasmocytes tumoraux et VCAM-1 des BMSCs. Cette adhérence provoque la sécrétion de plusieurs protéines et des cytokines tel que RANKL, IL-6, IL-11, IL-1 β , MIP-1 α ainsi que des TNF. Ces molécules induisent à la fois la prolifération des cellules MM ainsi que la prolifération des ostéoclastes[120]–[125].

En outre, des études ont montré que des OBL venant des patients souffrant d'un myélome multiple sont plus susceptibles à l'apoptose induite par le TNF α [126]. D'autres études réalisées par Evans et al. ont montré également la sécrétion des facteurs inhibiteurs des OBL par les cellules du MM[127]. La nature de ces facteurs est mal connue. Des candidats possibles incluent DKK1 ainsi que d'autres facteurs qui bloquent la voie de signalisation Wnt[128]–[130], ainsi que des interleukines comme IL-3[131] et IL-7[132].

2.4. Diagnostic

Le diagnostic de myélome multiple repose sur la mise en évidence d'un anticorps monoclonal et/ou de chaînes légères clonales et une analyse de la moelle osseuse décelant des plasmocytes anormaux. La stadification fait appel à l'imagerie médicale recherchant des lésions osseuses. Une autre constatation courante est une élévation du taux de calcium sanguin et une insuffisance rénale.

2.4.1. Dépistage

Une électrophorèse des protéines du sang et des urines peut mettre en évidence la présence d'une paraprotéine (protéine monoclonale ou protéine M), avec ou sans réduction des autres immunoglobulines (normales) ou des chaînes légères libres d'immunoglobulines (Figure 2). La paraprotéine est une immunoglobuline anormale produite par le clone tumoral. Des mesures quantitatives de la paraprotéine sont nécessaires pour établir un diagnostic et surveiller la maladie.

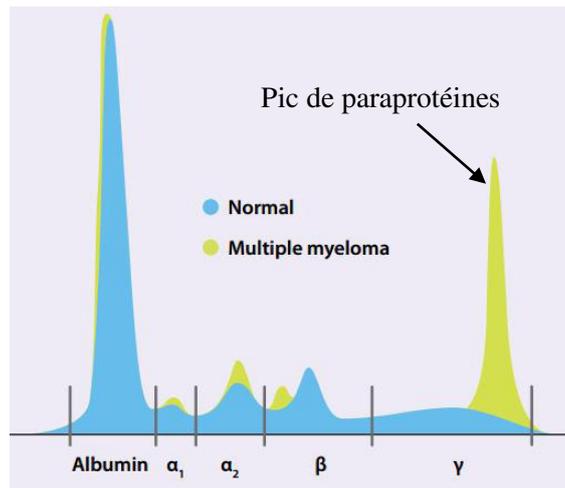


Figure 2 : électrophorèses des protéines provenant du sérum d'un individu sain (graphe bleu) et d'un individu atteint de myélome multiple (graphe vert) montrant un pic de paraprotéine (anticorps monoclonal).

En théorie, le myélome multiple peut produire toutes les classes d'immunoglobulines, mais les paraprotéines IgG sont les plus courantes, suivies des IgA et IgM. Les myélomes IgD et IgE sont très rares[133]–[135]. De plus, les chaînes légères des anticorps peuvent être sécrétées isolément : chaînes légères κ (kappa) ou λ (lambda), correspondant à un « myélome à chaînes légères ». Les personnes sans présence d'une protéine monoclonale peuvent avoir un myélome « non sécrétoire » (ne produisant pas d'immunoglobulines); cela représente environ 3% de toutes les personnes atteintes de myélome multiple[136].

Des résultats supplémentaires peuvent inclure une élévation du taux de calcium (lorsque les ostéoclastes décomposent les os, les libérant dans la circulation sanguine), une élévation du taux de créatinine sérique due à une fonction rénale réduite, qui est principalement due aux dépôts de paraprotéines dans le rein, ainsi que des immunoglobulines totales, l'uromoduline et l'albumine[137].

D'autres tests sanguins comme la quantification de la β 2-microglobuline peuvent fournir des informations pronostiques. Aux analyses sanguines et urinaires s'ajoute l'imagerie du squelette. Il peut s'agir d'une analyse par rayons X du crâne, du squelette axial et des os longs proximaux

et/ou d'une imagerie par IRM qui est plus sensible que la radiographie simple dans la détection des lésions lytiques. Parfois, une tomодensitométrie est effectuée pour mesurer la taille des plasmocytomes des tissus mous.

2.4.2. Cyto et Histopathologie

Un myélogramme et parfois une biopsie de moelle osseuse est généralement réalisée pour estimer le pourcentage de moelle osseuse occupé par les plasmocytes. Ce pourcentage est un des éléments utilisés comme critère diagnostique du myélome. L'immunohistochimie ou la cytométrie en flux détecte les plasmocytes qui expriment certains marqueurs de surface comme le CD56, CD38, CD138 et CD319 et n'expriment pas d'autres comme CD19, CD20[138]. La cytométrie en flux est souvent utilisée pour établir la nature clonale des plasmocytes, qui n'expriment généralement que la chaîne légère kappa ou lambda. La cytogénétique peut également être réalisée dans le myélome à des fins pronostiques, y compris une hybridation in situ fluorescente spécifique au myélome et un caryotype virtuel.

Les plasmocytes observés dans le myélome multiple sont dystrophiques. Dans leur cytoplasme, l'appareil de Golgi produit généralement une zone de couleur claire adjacente au noyau, appelée halo périnucléaire, parce qu'ils produisent activement des anticorps. Le noyau unique est excentrique, déplacé par un cytoplasme abondant. D'autres morphologies courantes observées, mais qui ne sont pas habituelles dans les plasmocytes normaux, comprennent :

Certaines études ont identifié des critères et des mutations génétiques qui servent à évaluer le risque d'atteinte par un myélome multiple. En effet, les personnes atteintes de délétion du chromosome 13 ou d'hypodiploïdie par cytogénétique conventionnelle, t (4; 14), t (14; 16), t (14; 20) ou 17p- par des études de génétique moléculaire, ou avec un indice d'étiquetage plasmatique élevé (3 % ou plus) sont considérés comme ayant un myélome à haut risque[139].

2.4.3. Classification

En 2003, le International Myeloma Working Group (IMWG) a défini les critères diagnostiques du myélome symptomatique, du myélome asymptomatique et de la gammopathie monoclonale de signification indéterminée (MGUS, monoclonal gammopathy of unknown significance)[138]. Ces critères ont par la suite été remis à jour en 2009 [140].

a- Myélome symptomatique

Les critères suivants doivent être réunis :

1-

Et/ou

Population plasmocytaire entre 10 et 60 %

ET

Absence de retentissement tissulaire (ROTI)

c- MGUS

Composant monoclonal < 30 g/L

ET

Population plasmocytaire clonale < 10% sur l'examen médullaire

ET

Absence de retentissement tissulaire (ROTI)

2.4.4. Stadification

Lorsque le diagnostic de MM est posé, il faut alors définir le stade de la maladie. Deux classifications sont actuellement utilisées. La première est celle de Salmon et Durie, établie en 1975 et encore largement utilisée. Celle-ci a été complétée par la classification internationale qui apporte des informations pronostiques.

a- Stadification de Salmon et Durie

Elle distingue 3 stades en fonction de l'existence de lésions osseuses, du taux d'hémoglobine, de la calcémie et de l'importance du composant monoclonal.

Le stade I- myélome de faible masse tumorale

Tous les critères diagnostiques suivants sont présents

Ou β 2-microglobuline ≥ 3.5 mg/L and < 5.5 mg/L

Stade III :

β 2-microglobuline ≥ 5.5 mg/L

2.5. Traitement

Au cours de la dernière décennie, de nouveaux agents sont devenus des traitements de myélome multiple, améliorant considérablement le pronostic de la maladie[142]. Le taux de survie à cinq ans a régulièrement augmenté[143]. Malgré l'évolution rapide des paradigmes de traitement, le myélome multiple reste incurable[144], [145]. Au fur et à mesure que les patients atteints de myélome multiple progressent dans leur maladie, ils peuvent recevoir une multitude de schémas thérapeutiques ultérieurs, chacun étant associé à des risques et toxicités uniques.

2.5.1. Les traitements conventionnels du myélome

Le traitement des patients atteints de myélome multiple comporte plusieurs volets, dont le traitement symptomatique et le traitement de fond.

Le traitement symptomatique et les soins de support ont considérablement amélioré la qualité et/ou la durée de vie des patients atteints de myélome multiple. Les antalgiques majeurs jouent un rôle important chez les patients présentant des douleurs en relation avec des localisations osseuses. L'administration d'immunoglobulines polyvalentes permet de pallier le déficit immunitaire humoral fréquemment observé chez ces patients et prédisposant à des infections pulmonaires souvent graves. L'administration de facteurs de croissance hématopoïétiques telles que l'érythropoïétine permet de réduire ou de prévenir l'anémie liée à la maladie elle-même ou aux traitements de fond. Les biphosphonates réduisent l'incidence des événements osseux tels que les fractures ou tassements vertébraux et l'hypercalcémie[146], [147].

A l'heure actuelle le myélome multiple reste très probablement une maladie incurable, en dehors du contexte très particulier de certains sujets jeunes recevant une allogreffe de moelle

osseuse[148]. Le traitement « à visée curative » s'est en revanche considérablement diversifié pendant la dernière vingtaine d'années avec l'introduction de nouvelles molécules ayant un mécanisme d'action différent de celui des agents anticancéreux conventionnels. Pendant environ cinquante ans, le traitement du myélome multiple a fait appel aux agents alkylants (melphalan, cyclophosphamide) associés à un stéroïde ou à l'association vincristine/adriamycine/dexaméthasone (VAD)[149]. Dans les années 90 l'intensification thérapeutique par du melphalan à fortes doses associé à la réinjection de cellules souches autologues s'est imposée comme étant le traitement de consolidation de choix chez les patients « jeunes » (de moins de 65 ans)[150]. Plusieurs études ont par la suite étudié la place de l'irradiation corporelle totale[151] ou l'administration de deux cures de melphalan à fortes doses[152]. L'introduction de ces thérapeutiques intensives a permis des gains importants à la fois en survie sans rechute et en survie globale.

Les inhibiteurs du protéasome sont l'une des classes d'agents les plus importantes à avoir émergé pour le traitement du myélome multiple au cours des deux dernières décennies, et constituent désormais un des piliers du traitement. Trois agents de cette classe ont été approuvés par la Food and Drug Administration des États-Unis : le bortézomib, composé de première classe, le carfilzomib de deuxième génération et le premier inhibiteur du protéasome oral, l'ixazomib. Ces agents agissent en inhibant le protéasome 26S, qui joue un rôle essentiel dans la pathogenèse et la prolifération de la maladie. L'inhibition du protéasome entraîne de multiples effets, notamment l'inhibition de la signalisation NF- κ B, l'accumulation de protéines malformées, entraînant un stress endoplasmique du réticulum et conduisant à la régulation négative des récepteurs des facteurs de croissance, la suppression de l'expression des molécules d'adhésion et l'inhibition de l'angiogenèse; ils sont souvent combinés à d'autres agents thérapeutiques, y compris les médicaments immunomodulateurs, les anticorps monoclonaux et les inhibiteurs de l'histone désacétylase.

Les immunomodulateurs (IMiD), comme le thalidomide et ses dérivés, le lénalidomide et le pomalidomide, sont aussi des agents thérapeutiques majeures dans le traitement du MM [153], où leur efficacité a été démontrée chez des patients nouvellement diagnostiqués, éligibles ou non à la transplantation autologue de cellules souches hématopoïétiques (ASCT), les patients ayant reçu une ASCT ou même en cas de maladie réfractaire/récidivante[153]. En plus des effets antiprolifératifs et pro-apoptotiques sur les cellules cancéreuses, les IMiD exercent une fonction de régulation immunitaire et interfèrent avec les interactions du microenvironnement tumoral[154]. *In vitro*, les IMiDs ont amélioré la prolifération des cellules T, la sécrétion d'IL-2 et IFN- γ et l'activation des cellules NK[155], [156]. Le lénalidomide a amélioré les réponses immunitaires induites par le blocage des points de contrôle immunitaires [157] et a inhibé la prolifération des cellules régulatrices T (Treg) [158]. *In vivo*, le lénalidomide a augmenté l'immunité anti-tumorale endogène[159], ainsi que le nombre de cellules T CD8 + mémoires et effectrices[160].

2.5.2. Nouvelles approches thérapeutiques

a- Myélome multiple asymptomatique

Pour l'heure, aucun traitement n'est recommandé pour les myélomes asymptomatiques en dehors d'essais thérapeutiques et seule une surveillance est préconisée. Les recommandations de l'IMWG préconisent de répéter le bilan 2 à 3 mois après le diagnostic puis tous les 4 à 6 mois pendant un an puis tous les 6 à 12 mois[161]. Cependant des essais cliniques ont montré le possible intérêt d'une intervention thérapeutique précoce pour les MM asymptomatiques[162].

b- Myélome Multiple symptomatique

Deux groupes de patients sont distingués, ceux éligibles à un traitement intensif (moins de 65 ans, voire 70 ans et absence de comorbidité importante) de ceux non éligibles à une autogreffe

de cellules souches hématopoïétiques (de façon générale, les patients de plus de 65 à 70 ans et/ou présentant une comorbidité importante).

Chez les sujets éligibles à une intensification thérapeutique, le principe du traitement de première ligne repose sur la succession de phases d'induction, d'intensification, de consolidation et de maintenance. La phase d'induction est actuellement constituée d'une triplé thérapeutique associant un inhibiteur de protéasome, un immunomodulateur de la famille des IMiD et de la dexaméthasone[163]. Quatre cycles sont habituellement réalisés, au cours desquels un recueil de cellules souches hématopoïétiques est réalisé après mobilisation par cyclophosphamide (Endoxan). L'intensification thérapeutique est réalisée par une autogreffe de cellules souches hématopoïétiques après conditionnement par du melphalan à haute dose[150], [151]. Un traitement de consolidation et de maintenance peut permettre d'améliorer la réponse et ainsi diminuer la maladie résiduelle[164]. Le traitement de consolidation comprend classiquement la combinaison utilisée dans la phase d'induction. Enfin, un traitement de maintenance est administré pendant une période d'un an, souvent par un immunomodulateur. Le lénalidomide a reçu l'AMM dans cette indication début Mars 2017. De nombreuses études ont montré une corrélation entre la qualité de la réponse au traitement et les taux de survie sans progression et survie globale dans le MM chez les sujets éligibles à un traitement intensif, d'où l'importance d'obtenir une réponse complète[165].

L'intensification thérapeutique par autogreffe de cellules souches périphériques n'est pas accessible aux patients âgés en raison de morbidités associées trop importantes. Cependant le traitement par la lénalidomide en combinaison avec la dexaméthasone améliore significativement la survie sans progression, par rapport au régime triplet basé sur un alkylateur MPT chez les patients âgés atteints d'un myélome multiple nouvellement diagnostiqué qui n'étaient pas éligibles pour la transplantation de cellules souches[166].

VMP (Bortezomib, Melphalan, Prednisone) : la combinaison VMP s'est avérée supérieure au MP pour la survie sans progression, la survie globale, la survie sans traitement et les taux de réponses complètes dans l'essai international de phase 3 VISTA (Velcade as Initial Standard Therapy)[167]. RD (Revlimid et Dexaméthasone) : un essai récent de phase 3 dirigé par la fondation internationale pour le myélome a montré la supériorité d'une combinaison par RD pendant 18 mois ou jusqu'à la rechute en comparaison d'un traitement associant MPT (melphalan, prednisone, thalidomide)[166].

2.5.3. Thérapie ciblée et immunothérapie

Aux traitements cités précédemment s'ajoute l'utilisation des anticorps monoclonaux ciblant les plasmocytes tumoraux. Les anticorps approuvés incluent le daratumumab, ciblant le CD38, et l'elotuzumab, ciblant SLAMF7. [168][169]–[171] [172], [173], ont été développés et ont démontré une efficacité prometteuse. Ces anticorps monoclonaux ciblent des marqueurs de surface des plasmocytes (CD38 et SLAMF7) et induisent une réaction de type ADCC (Antibody dependent cell-mediated cytotoxicity) permettant l'activation des cellules NK contre les cellules tumorales. Les anticorps anti CD38 font l'objet de très nombreuses études cliniques en monothérapie et en combinaison, à la fois dans des situations de maladie avancée et en première ligne de la maladie[174]. L'antigène de maturation des cellules B (BCMA) serait impliqué à la fois dans la croissance des cellules myélomateuses et dans l'immunodéficience induite par la maladie[175]. Un anticorps anti-BCMA a montré une activité cytotoxique dans un modèle murin[176]. Le BCMA est largement exprimé sur des échantillons de myélome frais avec une internalisation rapide après liaison à un anticorps spécifique, ce qui suggère qu'elle pourrait être une cible intéressante pour une approche immunoconjuguée[177], [178]. Le BCMA est également exploré comme cible pour la thérapie adoptive par lymphocytes T[179]. Des essais de cellules CART-BCMA en phase précoce sont actuellement en cours chez les patients atteints de myélome récidivant et réfractaire (NCT 02546167; NCT02658929) et un

rapport récent d'une augmentation de la dose chez 12 patients a montré de très bonnes réponses partielles chez 3 patients (NCT02215967) [180]. De plus, une étude de phase 1 en cours évalue la sécurité du BI836909, un anticorps monoclonal bispécifique CD3/BCMA chez les patients en rechute MM(NCT02514239).

Une nouvelle génération d'immunothérapies dans la prise en charge des cancers est représentée par les inhibiteurs de checkpoint PD-1 et PD-L1[181], [182]. Ces approches sont actuellement à l'étude, ce qui permettra d'en définir la place dans l'arsenal thérapeutique du MM.

Les thérapies ciblées de type « petites molécules » explorées dans le myélome incluent le vénétoclax (inhibiteur de Bcl-2)[183], le S63845 (inhibiteur de Mcl-1)[184] et le selinexor (inhibiteur de XPO-1)[185]. Ces derniers traitements font particulièrement l'objet d'étude chez des patients présentant des sous-groupes moléculaires spécifiques de tumeurs. En effet, le venetoclax semble avoir une efficacité notable dans les MM avec t(11 ;14) qui présentent un ratio Bcl-2/Bcl-XL élevé. Il sera intéressant d'étudier le nouvel inhibiteur de Mcl-1 dans les MM avec gain de 1q – siège du gène MCL-1. Par ailleurs, il a été rapporté une efficacité particulière du sélinexor dans les cancers du poumon présentant une mutation de KRAS, famille de gènes qui est souvent muté dans le myélome multiple.

2.5.4. Evaluation de la réponse au traitement

L'évaluation de la réponse au traitement du myélome repose essentiellement sur le suivi du composant monoclonal dans le sang et/ou dans les urines. L'examen de la moelle osseuse est indiqué afin de définir la réponse complète stringente en évaluant le pourcentage de plasmocytes tumoraux présents dans la moelle (par technique de cytométrie en flux et de next generation sequencing)[186], [187].

Critères de réponse

Ces paramètres permettent de définir les situations suivantes

a- Rémission complète « vraie » :

lésion osseuse ou d'un plasmocytome des tissus mous ou l'augmentation de volume d'une lésion préexistante.

Les nouvelles technologies d'analyse de la moelle osseuse (cytométrie en flux et NGS) permettent de définir des rémissions moléculaires avec des seuils de sensibilité de l'ordre de 1 cellule pathologique pour 10^5 ou 10^6 .

Chapitre III : Leucémie Aiguë Myéloïde.

3.1. Définition et facteurs de risque

Le mot leucémie vient du grec « leuko » et « hemia » qui signifient « un grand nombre de globules blancs ». La leucémie aiguë myéloïde (AML en anglais ou LAM en français) est une hémopathie développée à partir des cellules progénitrices des lignées myéloïdes (Figure 1). Cette néoplasie est caractérisée par la croissance rapide anormale des cellules immatures et un défaut de différenciation, avec un retentissement important sur l'hématopoïèse normale [188], [189]. Les leucémies aiguës myéloïdes sont le type le plus commun parmi les leucémies de l'adulte, représentant 80% des cas dans cette tranche d'âge. Les LAM peuvent survenir « de novo » ou évoluer sur un terrain leucémique, tel qu'une myélodysplasie ce qui représente un mode évolutif fréquent chez les personnes âgées. De nos jours, les taux de survie dans le jeune groupe de patients se sont améliorés alors que malheureusement le pronostic chez les patients de plus de 65 ans reste péjoratif avec une mortalité de 70% dans l'année suivant le diagnostic [188], [190].

Le développement de la leucémie aiguë myéloïde est associé à plusieurs facteurs de risque, notamment les anomalies génétiques, l'âge, les maladies hématologiques antérieures, l'exposition aux produits chimiques ou aux rayonnements, et l'exposition à plusieurs agents thérapeutiques cytotoxiques et mutagènes.

3.2. Epidémiologie

L'incidence mondiale la plus élevée de LAM a été observée aux États-Unis, en Australie et en Europe occidentale. Aux États-Unis, le nombre de cas s'élève à un total de trois à cinq pour 100 000 habitants. En 2015, 20 830 nouveaux cas de LAM ont été diagnostiqués. L'incidence de la LAM est fortement liée à l'âge. Par exemple, environ 1,3 cas de LAM de moins de 65 ans ont été signalés sur 100 000 personnes. Le nombre de cas augmente avec l'âge des individus,

pour atteindre environ 12,2 cas chez des patients de plus de 65 ans sur 100 000 individus[188]. L'âge médian de diagnostic de la LAM est d'environ 68 ans et la prévalence est plus élevée chez les hommes que chez les femmes. En effet, les hommes sont 1,2 à 1,6 fois plus susceptibles de développer un LAM durant leur vie selon des études récentes faites sur les populations des États-Unis, Royaume-Uni, Canada, Danemark, Australie et l'Algérie[191]–[195].

Selon le programme SEER (Surveillance, Epidemiology, and End Result) des États-Unis, l'incidence des LAM est également liée à l'origine ethnique. Le SEER a documenté dans sa base de données que les enfants âgés de 1 à 4 ans ont montré une incidence de 0,8 pour 100 000 personnes chez les garçons et les filles. De plus, au cours de la première année de vie, la race caucasienne présente une incidence 3 fois plus élevée que la population de race noire. Les rapports générés par le programme SEER entre 2009 et 2015 ont montré que seulement 28,3% des patients atteints de LAM étaient vivants 5 ans après le diagnostic[196].

En 2019, 21 450 nouveaux cas de LAM ont été prévus aux États-Unis parmi lesquels 11 650 sont des hommes et 9 800 sont des femmes. La population qui est la moins affectée sont les jeunes qui ont moins de 20 ans avec seulement 4.5% des cas[196]. Le nombre de morts aux États-Unis a été estimé à 10 920 au total parmi lesquels on compte 6 290 hommes et 4 630 femmes[197].

Les données françaises des registres des cancers du réseau Francim, estiment l'incidence annuelle des LAM en France à 2800 nouveaux cas, avec un âge médian au diagnostic de 71 ans et un sexe ratio hommes/femmes de 1,1. Le taux d'incidence en France est superposable à celui observé en Europe[198], [199] et est supérieur au taux d'incidence standardisé sur la population mondiale.

Toutes ces études démontrent la nécessité de développer de nouveaux traitements, en particulier chez les sujets âgés.

3.3. Physiopathologie

La leucémie aiguë myéloïde est une maladie clonale maligne caractérisée par différentes altérations moléculaires et génétiques et une faible production de cellules hématopoïétiques saines. Ces altérations inhibent la différenciation des cellules et induisent la prolifération ou l'accumulation de blastes[200]. Les blastes remplacent le tissu hématopoïétique normal, déclenchant l'apparition de cytopénies[201], [202]. L'accumulation de cellules immatures cancéreuses commence dans la moelle osseuse, mais dans la plupart des cas, elle se propage et s'accumule rapidement dans le sang et se propage parfois à d'autres parties du corps comme les ganglions lymphatiques, la rate, le foie, les testicules et le système nerveux central[203], [204]. Les cellules blastiques, ou « blastes » se caractérisent par leur activité myéloperoxydase, et par leur immunophénotype de molécules de surface ou intracytoplasmiques [205].

Plusieurs anomalies cytogénétiques récurrentes ont été décrites dans certaines formes de LAMs, telles que t (8;21), t (15;17), l'inversion 16, la trisomie 8 et les suppressions de parties, ou de la totalité, des chromosomes 5 ou 7 [206]. Souvent, les translocations chromosomiques se produisent dans des régions critiques qui contiennent des proto-oncogènes, ce qui génère une protéine de fusion anormale qui est généralement un facteur de transcription ou une protéine impliquée dans la signalisation intracellulaire causant des troubles de croissance et de différenciation cellulaires, ce qui à son tour augmente la probabilité d'une transformation maligne. Quelques exemples de gènes mutés sont le facteur de liaison central (CBF), le récepteur d'acide rétinoïque- α (RAR- α), la famille des gènes HOX, MLL, et autres. D'autres mutations activatrices d'oncogènes peuvent mener à la transformation maligne parmi lesquelles sont celles qui affectent FLT3, KIT, N-RAS, FES, FOS, GATA-1, JUN B, MPL, MYC, p53, PU.1, RB, WT1, WNT, NPM1 et CEPBA[207].

3.4. Diagnostic

3.4.1. Dépistage

Le premier indice d'une leucémie aiguë myéloïde est généralement un résultat anormal d'une formule de numération sanguine complète. Alors qu'un excès de globules blancs anormaux (leucocytose) est une constatation courante avec la leucémie avec la présence de blastes dans le sang, la leucémie aiguë myéloïde peut également se manifester par des diminutions de la numération des plaquettes, des globules rouges ou des leucocytes normaux.[208] Alors qu'un diagnostic présumé de LAM peut être établi en examinant le frottis sanguin périphérique lorsqu'il y a des blastes leucémiques circulants, un diagnostic définitif nécessite un myélogramme qui confirmera un envahissement médullaire par plus de 20% de cellules blastiques [209]–[212]. La moelle osseuse ou le sang est examinée au microscope, par cytométrie en flux ainsi que par analyse cytogénétique et moléculaire afin de confirmer le diagnostic de leucémie, différencier la LAM des autres types de leucémie, et pour pouvoir classer la maladie selon les classifications FAB et OMS. Certaines études peuvent également être effectuées pour rechercher des mutations spécifiques dans des gènes tels que *FLT3* (CD135), la *NPM1* et *KIT* (CD117), qui peuvent impacter sur la prise en charge de la maladie[213].

D'autres colorations sur des frottis de moelle osseuse ou du sang frais peuvent être appliqués comme le noir Soudan combiné à la myéloperoxydase pour pouvoir bien différencier la LAM de la leucémie aiguë lymphoïde et bien classer la maladie[214].

3.4.2. Classification

L'idée de classer les maladies généralement et les LAM spécifiquement est basée sur l'importance d'organiser les différentes maladies en un groupe partageant des caractéristiques biologiques similaires. De plus, il est essentiel de classer ces hémopathies pour avoir une

meilleure compréhension de la pathogenèse. Définir différents sous-groupes dans une classification est un outil qui peut conduire à identifier le pronostic et la meilleure approche thérapeutique en fonction du type de LAM[215].

A l'heure actuelle il existe deux classifications différentes pour les LAM ; une ancienne classification qui s'appelle FAB (Franco-Américano-Britannique) et une plus nouvelle classification établie par l'OMS et s'appelle « World Health Organization classification of AML ».

a- Classification « Franco-Américano-Britannique » (FAB)

En 1976, pour la première fois, un système de classification international a été défini afin d'établir et organiser les différents sous-types de LAM. Ce système reconnu par la classification « franco-américano-britannique », classait les LAM en six sous-types différents de M1 à M6, en utilisant comme référence les caractéristiques morphologiques et la cytochimie des cellules leucémiques. La discrimination entre les monoblastes et les myéloblastes a été réalisée en tenant compte de la morphologie et en utilisant l'alpha-naphtyl acétate estérase (ANAE) pour établir les sous-types M1-M6 des LAM.

Plus tard, en 1985, le groupe FAB composé de Bennett et ses collègues, a identifié un manque dans la classification en raison du fait que les caractéristiques morphologiques n'étaient pas suffisantes pour faire la distinction entre les myéloblastes et les lymphoblastes. Par conséquent, le groupe FAB a utilisé la myéloperoxydase (MPO) ou la réaction du noir Soudan pour identifier et différencier la LAM de la LAL. De plus, au cours de cette classification FAB révisée, des marqueurs immunologiques ont été utilisés pour identifier deux nouveaux sous-types de LAM; la leucémie myéloïde aiguë avec une différenciation myéloïde minimale (AML-M0) et la leucémie mégacaryoblastique (AML-M7) présentant toutes deux une réaction négative au noir Soudan, complétant la classification FAB connue de nos jours[215], [216]. (Tableau 4).

Type de LAM	Nom
M0	Leucémie indifférenciée
M1	Leucémie myéloblastique non différenciée
M2	Leucémie myéloblastique différenciée
M3	Leucémie promyélocytaire
M4	Leucémie myélomonocytaire
M5	Leucémie monoblastique
M6	Leucémie erythroblastique
M7	Leucémie mégacaryoblastique

Tableau 4: classification FAB (franco-américano-britannique) des AML.

b- Classification de l'OMS « World Health Organization classification »

L'amélioration réalisée dans le diagnostic et la prise en charge des patients atteints de LAM au cours des années qui ont suivi la mise en place de la classification FAB, a rendu nécessaire d'intégrer toutes ces nouvelles données générées dans un nouveau système de classification proposé par l'Organisation mondiale de la santé (OMS). En 2001, l'OMS a généré ce nouveau système pour classer les différents types de LAM et en 2008, cette classification a eu sa première mise à jour[217]. Enfin, en 2016, la nouvelle version a été publiée[218], [219].

Cette méthode de classement prend en compte plusieurs aspects, y compris les informations génétiques comme la génétique cellulaire et moléculaire, l'immunophénotype, la morphologie et les données cliniques, pour classer les LAM en six catégories principales: LAMs avec des anomalies cytogénétiques récurrentes, LAMs avec anomalies associées aux myélodysplasies, néoplasies myéloïdes post chimiothérapie, LAMs non classées par ailleurs (NOS), sarcome myéloïde (sarcome granulocytaire) et prolifération myéloïde liée à la trisomie 21 constitutionnelle (syndrome de Down) (tableau 5). Dans la catégorie des LAMs liées à des anomalies génétiques, une amélioration peut être observée par rapport à la version 2008. Les translocations chromosomiques décrivaient 11 sous-types différents de LAMs auxquelles se sont ajoutés, dans la nouvelle version, deux nouveaux types pour les mutations de NPM1 et CEBPA[188], [218], [220].

Type	Description	
LAMs avec des anomalies cytogénétiques récurrentes	<p>AML avec t (8;21) (q22; q22); RUNX1-RUNX1T1</p> <p>AML avec inv (16) (p13.1q22) ou t (16; 16) (p13,1; q22); CBFβ-MYH11</p> <p>APL avec PML-RARA</p> <p>AML avec t (9; 11) (p21.3; q23.3); MLLT3-KMT2A</p> <p>AML avec t (6; 9) (p23; q34.1); DEK-NUP214</p> <p>AML avec inv (3) (q21.3q26.2) ou t (3; 3) (q21,3; q26,2); GATA2, MECOM</p> <p>AML (mégacaryoblastique) avec t (1; 22) (p13,3; q13,3); RBM15-MKL1</p> <p>AML avec BCR-ABL1 (entité provisoire)</p> <p>AML avec NPM1 muté</p> <p>AML avec mutations bialléliques de CEBPA</p> <p>AML avec RUNX1 muté (entité provisoire)</p>	
LAMs avec anomalies associées aux myélodysplasies	<p>Soit faisant suite à un syndrome myélodysplasique ou un syndrome myéloprolifératif/dysplasique</p>	
	<p>Soit avec anomalie(s) cytogénétique(s) de syndrome myélodysplasique :</p> <table border="1"> <tr> <td> <p>Anomalies déséquilibrées :</p> <p>-7/del(7q)</p> <p>del(5q)/t(5q)</p> <p>i(17q)/t(17p)</p> <p>-13/del(13q)</p> <p>del(11q)</p> <p>del(12p)/t(12p)</p> <p>idic(X)(q13)</p> </td> <td> <p>Anomalies équilibrées :</p> <p>t(11;16)(q23.3;p13.3)</p> <p>t(3;21)(q26.2;q22.1)</p> <p>t(1;3)(p36.3;q21.2)</p> <p>t(2;11)(p21;q23.3)</p> <p>t(5;12)(q32;p13.2)</p> <p>t(5;7)(q32;q11.2)</p> <p>t(5;17)(q32;p13.2)</p> <p>t(5;10)(q32;q21.2)</p> <p>t(3;5)(q25.3;q35.1)</p> </td> </tr> </table>	<p>Anomalies déséquilibrées :</p> <p>-7/del(7q)</p> <p>del(5q)/t(5q)</p> <p>i(17q)/t(17p)</p> <p>-13/del(13q)</p> <p>del(11q)</p> <p>del(12p)/t(12p)</p> <p>idic(X)(q13)</p>
<p>Anomalies déséquilibrées :</p> <p>-7/del(7q)</p> <p>del(5q)/t(5q)</p> <p>i(17q)/t(17p)</p> <p>-13/del(13q)</p> <p>del(11q)</p> <p>del(12p)/t(12p)</p> <p>idic(X)(q13)</p>	<p>Anomalies équilibrées :</p> <p>t(11;16)(q23.3;p13.3)</p> <p>t(3;21)(q26.2;q22.1)</p> <p>t(1;3)(p36.3;q21.2)</p> <p>t(2;11)(p21;q23.3)</p> <p>t(5;12)(q32;p13.2)</p> <p>t(5;7)(q32;q11.2)</p> <p>t(5;17)(q32;p13.2)</p> <p>t(5;10)(q32;q21.2)</p> <p>t(3;5)(q25.3;q35.1)</p>	
Néoplasies myéloïdes post chimiothérapie	<p>Cette catégorie comprend les personnes qui ont déjà subi une chimiothérapie et / ou une radiothérapie et qui ont ensuite développé une LAM ou un SMD.</p>	
LAMs non classées par ailleurs (NOS)	<p>LA Myéloblastique avec différenciation minimale</p> <p>LA Myéloblastique sans maturation</p> <p>LA Myéloblastique avec maturation</p> <p>LA myélomonocytaire</p> <p>LA monoblastique / monocytaire</p> <p>LA érythroïde aiguë ou pure</p> <p>LA mégacaryoblastique</p> <p>LA Myéloblastique à composante basophile</p> <p>LA avec myélofibrose</p>	
Sarcome myéloïde (granulocytaire)	<p>Sarcomes myéloïdes de novo sans évidence de maladie médullaire.</p>	
Prolifération myéloïde liée à la trisomie 21 constitutionnelle	<p>Réaction leucémoïde transitoire.</p> <p>LAM associée à la trisomie 21 constitutionnelle.</p>	

Tableau 5 : classification des AML selon l'OMS.

3.5.Traitement

Le traitement général des LAM est resté le même pendant plus de 30 ans. Les protocoles de traitement qui utilisent les chimiothérapies ont en effet très peu évolués. La prise en charge va dépendre de facteurs pronostiques. L'âge du patient et son état physique est l'un des principaux paramètres qui permettent d'établir la meilleure stratégie thérapeutique par les cliniciens. Le profil cytogénétique et moléculaire des blastes est également un élément important pour le choix du traitement de consolidation des patients répondeurs [221]. En utilisant ce profil, les patients atteints de LAM peuvent être classés en cas favorables, intermédiaires et indésirables, ce qui peut aider à mieux adapter la thérapie[195].

3.5.1. Traitements conventionnels par chimiothérapie.

Le traitement standard de la LAM est la chimiothérapie. La combinaison d'agents chimio-thérapeutiques comme une anthracycline (daunorubicine ou idarubicine) et la cytarabine (ARA-C (Cytosine-Arabinoside)), est l'approche thérapeutique standard pour les patients atteints de LAM. Le protocole thérapeutique est composé de deux phases; le premier a pour objectif d'obtenir une rémission complète [222], [223]. Dans la deuxième phase, une fois la rémission complète atteinte, il est nécessaire de maintenir la réponse. Les patients atteints de LAM sont généralement traités avec des doses moyennes ou élevées d'ARA-C et, en plus de cela, en fonction de la classification favorable/intermédiaire/défavorable du patient, une greffe allogénique si un donneur est disponible, ou une intensification avec autogreffe dans le cas contraire.

La cytarabine, ou aussi cytosine arabinoside (ARA-C), a été synthétisée pour la première fois en 1958 et utilisée dans le traitement de la LAM depuis 1969 après l'approbation de l'agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux (FDA). L'administration orale d'ARA-C est inefficace en raison du métabolisme rapide du médicament par le foie et les intestins. Ainsi, ARA-C est appliqué par injection intraveineuse ou sous-cutanée. L'ARA-C ne

peut tuer que les cellules en cours de synthèse d'ADN (phase S) et les cellules en transition de la phase G1 à la phase S. Ce composé présente une forte inhibition de la synthèse d'ADN en inhibant l'ADN polymérase. Le médicament peut également provoquer des aberrations chromosomiques comme des cassures et des fragmentations importantes. Une fraction du médicament peut être incorporée dans l'ADN et l'ARN[224], [225].

Les anthracyclines constituent le deuxième groupe de molécules utilisés pour le traitement des LAM. Ces médicaments chimio-thérapeutiques avaient été découverts dans les années 1960 à partir d'extraits de *Streptomyces peucetius*. Ce groupe contient quatre différentes molécules ; la daunorubicine (DNR), la doxorubicine (DOX), l'épirubicine (EPI) et l'idarubicine (IDA). Ces agents agissent comme des intercalaires d'ADN. Par insertion dans la double hélice d'ADN ils inhibent la topoisomérase II, et bloquent la synthèse ADN / ARN / protéine. Ils provoquent aussi la fragmentation de l'ADN et inhibent sa réparation. Finalement, les anthracyclines se réduisent dans les cellules en un radical libre de type semiquinone formant des espèces réactives de l'oxygène (ROS), responsables de toxicité, notamment myocardique. Une concentration élevée de ROS produira un stress oxydatif, des dommages à l'ADN et une peroxydation lipidique conduisant à l'apoptose[226]–[228].

La mitoxantrone est également une molécule de synthèse, apparentée aux anthracyclines et qui inhibe la topoisomérase II de façon similaire et cause l'apoptose cellulaire par des mécanismes similaires à ceux causés par les anthracyclines.

Comme mentionné précédemment, le traitement des LAM est composé de deux phases ; la première phase est l'induction et la deuxième phase est la consolidation.

a- Phase d'induction

L'objectif de cette phase est d'éliminer le plus rapidement possible le plus grand nombre de cellules leucémiques chez le patient nouvellement diagnostiqué. La « combinaison 3 + 7 » est

la stratégie thérapeutique la plus couramment utilisée chez les patients atteints de LAM, dans laquelle ils reçoivent 45 mg/m² ou 60 mg/m² d'une anthracycline sous forme de daunorubicine par voie intraveineuse pendant 3 jours. La dose de daunorubicine peut être augmentée chez les patients présentant des mutations considérées comme de mauvais pronostic comme DNMT3 et KMT2A[229]–[234]. Ces patients reçoivent également 100 mg/m² de cytarabine par voie intraveineuse pendant 7 jours. Cette combinaison a montré une rémission complète chez 65 à 70% des patients âgés de 18 à 60 ans. De plus, des essais cliniques réalisés ont démontré une rémission complète dans 80% des cas de LAM avec un traitement à haute dose de cytarabine associé à de l'idarubicine et de l'étoposide. Chez les patients âgés de plus de 60 ans, le taux de rémission est plus faible[235] dû à la présence des anomalies cytogénétiques qui causent une résistance à ce type de chimiothérapie. Habituellement, les jeunes adultes de moins de 60 ans sont les meilleurs candidats au traitement (3+7) et le niveau d'intensité peut varier en fonction de la santé du patient.

b- Phase de consolidation

Suite à la vérification de l'élimination de la majorité des cellules leucémiques durant la phase d'induction, la phase de consolidation commence. Cette phase aussi nommée phase de post-rémission, se focalise sur l'élimination du reste des cellules leucémiques cancéreuses et aussi prévient toute rechute possible du patient. La stratégie suivie durant cette phase contient à la fois, des chimiothérapies administrées ainsi que des greffes allogéniques ou autologues de moelle osseuse.

La chimiothérapie est généralement le premier recours chez les patients éligibles. Chez les jeunes patients, la chimiothérapie consiste à administrer 2 à 4 cycles de cytarabine en utilisant une condition des concentrations suivantes : dose élevée (3g/m²), dose intermédiaire (400 mg/m²) ou dose standard (100 mg/m²)[236]–[238].

Normalement, les patients qui présentent un risque élevé de rechute sont les patients qui vont être orientés vers une consolidation par une allogreffe ou une autogreffe. Les allogreffes ont un avantage sur les autogreffes en terme d'activité antileucémique puisqu'elles sont associées à une réaction de type greffon contre leucémie mais également une toxicité plus importante en raison de la réaction de greffon contre l'hôte qui n'est pas observée en cas d'une autogreffe[239]–[241].

3.5.2. Thérapies ciblées

Malgré toutes les options thérapeutiques mentionnées ci-dessus qui utilisent des molécules cytotoxique systémiques, la majorité des patients seront soit d'emblée réfractaires au traitement soit présenteront une rechute après une réponse initiale. Ces patients sont le plus souvent atteints de mutations génétiques et d'aberrations chromosomiques. Parmi ces mutations on peut citer ; des mutations qui touchent le gène NPM1 ainsi que le gène codant pour un récepteur à activité tyrosine kinase FLT3 (CD135). Un grand nombre d'études récentes sont à la recherche de drogues qui peuvent pallier le problème d'augmentation du nombre des patients présentant un mauvais pronostic.

Des inhibiteurs des récepteurs à activité tyrosines kinases (TKR) étaient largement utilisés dans plusieurs cancers solides. A l'heure actuelle, Ils forment un centre d'intérêt aussi pour les LAM et sont en cours de développement. L'inhibition de la FLT3 a été démontrée comme une cible thérapeutique importante[242], [243]. D'une part, le sorafénib a démontré la possibilité d'obtenir des rémissions complètes dans le cadre d'études cliniques de phase I et II. Par contre, les patients qui ont participé à ces études ont fait face à une rechute durant les 9 mois qui ont suivi l'obtention de la rémission[244]. La midostaurine, un autre inhibiteur de FLT3, de première génération, a été testé chez les patients[245]–[248]. Les patients ont développé une résistance contre cet inhibiteur comme dans le cas de sorafénib. En revanche, la midostaurine

en combinaison avec d'autres drogues chimio-thérapeutiques a montré une meilleure réponse chez les patients[249].

Pour surmonter le problème de la résistance acquise aux inhibiteurs de FLT3, la focalisation de la recherche clinique s'est déplacée vers deux inhibiteurs de FLT3 de deuxième génération ; le crénolanib et le gilteritinib (approuvé par la FDA), car les deux démontrent une activité contre les mutations FLT3-ITD et FLT3-TKD. Des études cliniques en phase II ont montré une réponse des patients à ces deux inhibiteurs incluant les patients qui ont déjà développé une résistance au inhibiteur de première génération[250], [251]. Le quizartinib est un autre inhibiteur de FLT3 qui a démontré, par administration par voie orale, durant la phase I d'un essai clinique réalisé sur 76 patients souffrant d'une rechute de LAM, un taux de réponse chez 30% des patients parmi lesquels 13% ont atteints un rémission complète[252].

Une autre approche a consisté à explorer l'utilisation des inhibiteurs de STAT, famille déjà utilisée dans le traitement de certains cancers solides. Ceci a été également exploité dans les LAM en se basant sur la relation entre la phosphorylation de STAT3 et le mauvais pronostic chez environ 50% des patients de LAM[253]. En effet, différents inhibiteurs de STAT3 (C188-9 et MM-206) testés ont démontré une induction de l'apoptose dans des lignées de LAM. Dans le même contexte, des co-inhibiteurs de STAT3 et STAT5 (OPB-31121) diminuaient la croissance des lignées de cancers solides ainsi que des lignées de LAM[254], [255].

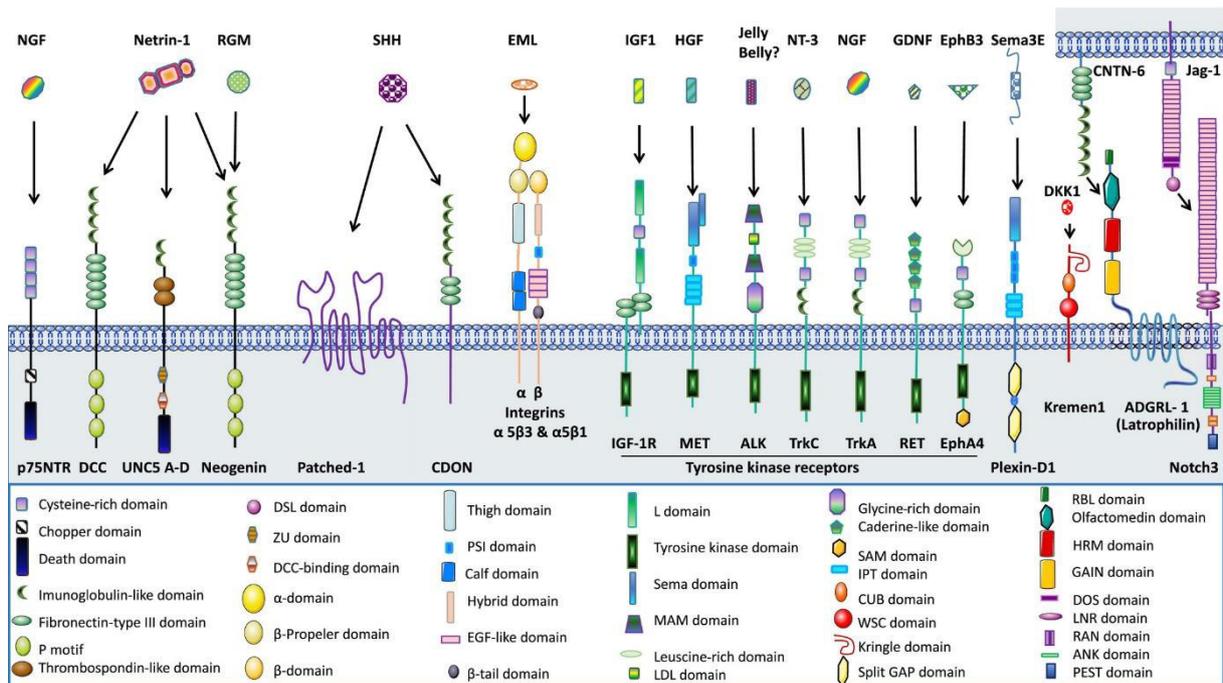
Dans le cas de la LAM l'immunothérapie par anticorps repose actuellement sur un immunoconjugué approuvé, avec de nombreuses autres approches en cours d'études cliniques. L'anticorps approuvé dès 2000 est le gemtuzumab ozogamicin qui est un anticorps humanisé conjugué à une molécule cytotoxique qui s'appelle la calichéamicine. Cet anticorps cible à la fois le CD33 normalement exprimé sur les lignées myéloïdes et clive l'ADN en causant des aberrations irréversibles menant à l'apoptose.[256]–[260]. Un anticorps ciblant le CD37 a été

également développé montrant un potentiel thérapeutique en cas de LAM[261]. Plusieurs autres approches, y compris des bispécifiques, sont en cours de développement.

Chapitre IV : Récepteurs à Dépendance

Les récepteurs cellulaires membranaires se divisent en deux grandes catégories. Des récepteurs classiques qui fonctionnent comme des interrupteurs on/off, induisant seulement une voie de signalisation positive en présence de leur ligand. D'autres récepteurs connus sous le nom de récepteurs à dépendance sont toujours actifs, mais leur activité dépend de la présence de leur ligand ; en présence de leur ligand ces récepteurs induisent une voie de signalisation positive qui mène à la survie et la croissance cellulaire alors qu'en absence de leur ligand, ils induisent des voies de signalisation apoptotiques souvent par à travers de l'activation extrinsèque des caspases.

Le rôle de ces récepteurs est souvent étudié lors de l'embryogenèse puisqu'ils sont impliqués souvent dans la différenciation cellulaire. Au cours des dernières décennies, plusieurs études ont montré aussi que ces récepteurs jouent un rôle dans la suppression des tumeurs en régulant la survie des cellules. Toutefois, les cellules cancéreuses développent plusieurs moyens pour échapper à la mort cellulaire. Ceci inclus la délétion de ces récepteurs à dépendance ou la surexpression du ligand. La nétrine-1 et ses récepteurs à dépendance DCC et UNC5B sont le prototype le plus étudié dans le cadre des cancers mais la famille des récepteurs à dépendance inclus une vingtaine de couples récepteurs ligand (Figure 3) parmi lesquels on trouve également l'ectodysplasine A1 et son récepteur EDAR.



Ana Maria Negulescu, Pat

Figure 3 : illustration de quelques ligands et récepteurs à dépendance

4.1. Les récepteurs à la nétrine-1 : DCC et la famille des UNC5

Au cours du développement du système nerveux durant l'embryogenèse, des connections entre les neurones sont établies d'une façon précise suite à la capacité des fibres neuronales, appelées axones, à croître en direction de leurs cibles à travers un réseau dense et complexe. Afin de bien s'orienter dans leur environnement et atteindre leur cible finale, les axones des neurones possèdent à leur extrémité une structure spécialisée qui s'appelle cône de croissance. Le cône de croissance interagit avec l'environnement et intègre des signaux à travers les récepteurs et des molécules de guidage exprimés à sa surface et dans l'espace intercellulaire. Les nétrines représentent une des différentes familles de molécules solubles secrétées dans cet environnement afin de transmettre au cône de croissance des signaux attractifs ou répulsifs pour moduler la croissance et l'orientation de l'axone.

Dès leur découverte durant le XX^{ème} siècle, les nétrines étaient étudiées principalement pour le rôle qu'elles jouaient dans la mise en place du système nerveux. Cependant, leur rôle dans le maintien de l'homéostasie des différents tissus devient de plus en plus étudié. Dans ce chapitre

nous détaillons les principaux récepteurs de nétrine-1 (DCC et UNC5) et nous examinerons leur implication dans les différents tissus ainsi que dans certains cancers.

4.1.1. Les nétrines

Les nétrines sont des petites molécules protéiques diffusibles qui forment une famille de protéines impliquées dans la guidance axonale. Elles ont obtenu leur nom du mot Sanskrit « netr » qui signifie « celui qui guide » en se référant à leur statut de facteurs chimiotropiques.

a- La famille des nétrines

Les nétrines étaient tout d'abord découvertes dans les nématodes particulièrement dans *C. elegans* en 1990, lors d'un criblage génétique visant à isoler les gènes impliqués dans la migration neuronale et le guidage axonal, et à cette époque elles étaient nommées UNC6 [262]. En 1994, le groupe de Marc Tessier-Lavigne purifia et clona pour la première fois chez les vertébrés, deux protéines homologues à UNC-6 nommées : nétrine-1 et nétrine-2. Dans la même équipe, un homologue de UNC-6 a été identifié comme un repère vital pour les axones commissuraux de rongeurs dans la moelle épinière [263]. Suite à cette découverte, les études réalisées ont identifié de nombreux orthologues à UNC-6 dans différentes espèces. Chez les invertébrés, des orthologues ont été décrits chez *Drosophila melanogaster* [264], chez la sangsue [265], et chez l'anémone de mer [266]. Chez les vertébrés, autres que les orthologues trouvés chez le poulet, des études ont identifié des orthologues à UNC-6 chez le poisson zèbre [267], le xénope, la souris, le rat, les singes et finalement l'homme. Les nétrines sont donc généralement structurellement fortement conservées entre les différentes espèces animales (nématodes, grenouille, souris, homme...)[263].

A partir de 2009, toutes les nétrines connues à l'heure actuelle avaient été découvertes. Chez les mammifères six nétrines ont été identifiées. Les nétrines-1, 3, 4 et 5 sont des protéines sécrétées, alors que G1 et G2 sont des protéines liées à la membrane, attachées par des résidus

de glycoposphatidylinositol [268]–[270]. Les deux versions, nétrine-G1 et nétrine-G2, ne se retrouvent que chez les vertébrés. On pense qu'elles ont évolué indépendamment des autres nétrines afin de faciliter la construction du cerveau [271].

b- Structure des nétrines

Les nétrines ont toutes une taille proche de 600 acides aminés et une masse moléculaire de 70kDa environ. Structuralement, les nétrines sont composées de trois domaines principaux. Certains domaines sont homologues à la laminine à l'extrémité amino-terminale. Le domaine C-terminal est le site où la majeure partie de la variation est observée entre les espèces et contient différents acides aminés qui permettent une interaction avec des protéines spécifiques dans la matrice extracellulaire ou à la surface de la cellule[268].

Outre la présence d'un peptide signal, l'extrémité N-terminale est caractérisée par la présence d'un domaine VI et d'un domaine V respectivement homologues aux domaines globulaires VI et V des laminines. Le domaine V des nétrines comporte trois motifs EGF (Epidermal Growth Factor) appelés V-1, V-2 et V-3 et apparentés à des répétitions similaires au domaine V des laminines. Les laminines sont sécrétées sous forme de gros hétérotrimères composés des sous-unités α , β et γ [272]. Les domaines V et VI des nétrines-1 à 3 et G sont similaires à la chaîne γ des laminines, tandis que ceux de la nétrine-4 sont similaires à la chaîne β [273]. La nétrine-5 est une exception puisqu'elle ne possède pas de domaine VI et son domaine V ne contient que deux répétitions EGF[274]. (Figure 4)

Le domaine C-terminal des nétrines, ne présente pas d'homologie avec les laminines. Pour les nétrines-1 à 4, ce domaine présente une structure en hélice α . Le domaine C des nétrines est notablement enrichi en acides aminés basiques qui seraient autant de sites de fixation pour les molécules chargées négativement de la matrice extracellulaire et de la surface cellulaire (exemple : héparine, chondroïtine sulfate, protéoglycanes et glucolipides)[263], [275]. La biodisponibilité des nétrines dépendrait donc à la fois de leur taux d'expression et de la

composition du milieu extracellulaire. Le domaine C, appelé C', des nétrines-G n'est pas conservé mais son caractère hydrophobe permet leur ancrage à la membrane plasmique via un groupement GPI[276], [277]. (Figure 4)

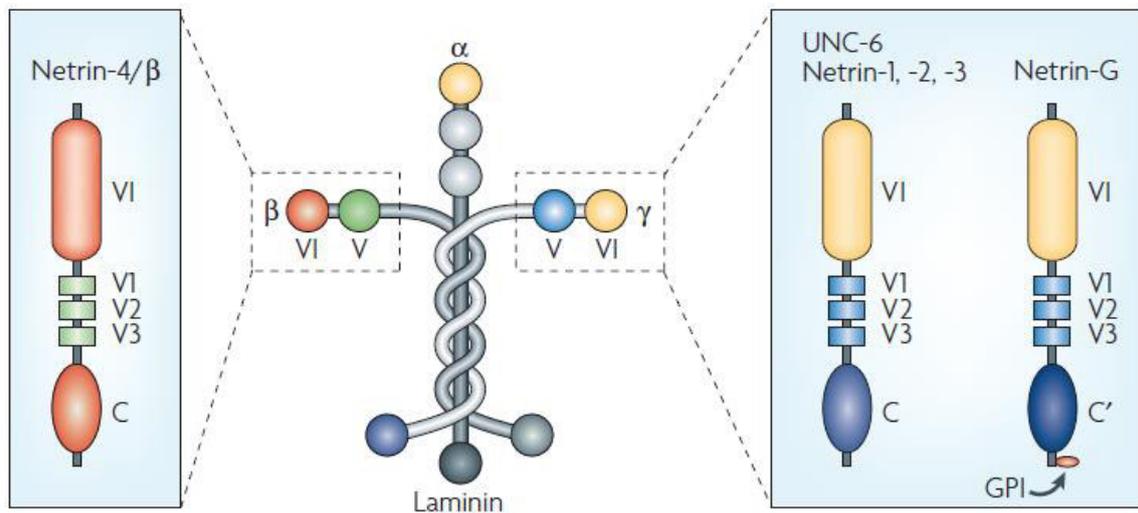


Figure 4 : structure de la famille des nétrines.

Représentation schématique montrant la structure des nétrines, apparentées à la laminine. La laminine est une protéine hétérotrimérique composée des chaînes α , β et γ . Les nétrines possèdent trois domaines : un domaine VI, un domaine V (composé de trois motifs EGF V1, V2 et V3) et un domaine C riche en acides aminés basiques. Les domaines VI et V des nétrines sont apparentés à la chaîne β (Nétrine-4/ β) ou à la chaîne γ (Nétrines 1, 2, 3, G1 et G2) de la laminine. Les nétrines G s'insèrent à la membrane par une ancre GPI (GlycosylPhosphatidylInositol). (Vincenzo Cirulli and Mayra Yebra 2007)

c- Expression de la nétrine-1 au cours du développement et chez l'adulte

La nétrine-1 est le membre le plus étudié de la famille des nétrines. Chez l'homme, la nétrine-1 est codée par le gène NTN1 localisé sur le chromosome 17p13-p12.

Les nétrine-1 joue un rôle important au niveau du chimiotactisme qui se déroule dans le système nerveux central en développement ; un axone en croissance se dirigera vers ou s'éloignera d'une concentration plus élevée de nétrine selon l'expression de ses récepteurs à la surface cellulaire. La nétrine-1 s'exprime depuis le début de la croissance embryonnaire lors de la formation du système nerveux primitif du fœtus. Elle s'exprime par suite dans les cellules neuroépithéliales

de la plaque du plancher, groupe de cellules sécrétrices spécialisées situées au niveau de la ligne médiane ventrale de la moelle épinière[278], ainsi que dans d'autres points du système nerveux, notamment le mésoderme somatique, le pancréas et le muscle cardiaque[276]. Son rôle principal est dans le guidage axonal, la migration neuronale et la morphogénèse de différentes structures de ramification[279]. Un gradient de nétrine-1 émanant de la plaque du plancher orienterait ainsi la migration des cellules et des axones par rapport à la ligne médiane ventrale[280]. Ainsi, une déficience en nétrine-1 chez la souris aboutit, entre autres, à des défauts majeurs de projections axonales vers la ligne médiane du cerveau, illustrés par l'absence de certaines commissures comme le corps calleux ou les commissures de l'Hippocampe et les commissures antérieures[281], laissant présager le rôle de la nétrine-1 dans le guidage de certains axones. D'autres études ont montré que les souris présentant des mutations dans le gène de la nétrine-1 étaient dépourvues d'axones commissuraux du cerveau antérieur et de la moelle épinière[282].

Il a été découvert que les nétrines jouent un rôle clé dans le développement et la régulation mature des tissus en dehors du système nerveux. Parmi les tissus non neuronaux impliqués figurent les tissus des poumons, du placenta[283], des vaisseaux sanguins, du pancréas, des muscles[284] et des glandes mammaires[279], [285]–[296]. La nétrine contribue à la morphogénèse des tissus en contrôlant la migration et l'adhésion cellulaires au cours du développement dans différents organes[277].

Dans les glandes mammaires en développement, les extrémités en croissance du réseau canalaire sont constituées de deux couches constituées de cellules épithéliales luminales et de cellules de coiffe. Les cellules luminales sécrètent la nétrine -1 qui se lie au récepteur néogénine (homologue du DCC) sur les cellules du capuchon. Cela permet une adhésion entre les deux couches de cellules, ce qui est nécessaire pour la morphogénèse correcte des bourgeons terminaux (TEB) dans les glandes mammaires. La perte du gène codant pour la nétrine-1 ou la

néogénine conduisent à une formation inappropriée de TEB, suggérant que plutôt que d'agir comme une molécule guide comme dans les systèmes neuronaux, la nétrine-1 sert d'adhésif dans le tissu mammaire[277], [295].

Au cours de la morphogénèse du poumon embryonnaire, les cellules épithéliales expriment la nétrine-1 et la nétrine-4. Ces nétrines entourent les bourgeons de l'endoderme dans la membrane basale, empêchant ainsi les cellules de l'extrémité distale d'exprimer DCC et UNC5B. Cela permet un développement normal du poumon et empêche la sur-ramification et le bourgeonnement potentiellement dangereux[277].

Dans le développement pancréatique, la nétrine-1 est exprimée dans les cellules canalaire épithéliales et se localise à la membrane basale. La nétrine-1 s'associe à plusieurs éléments de la matrice extracellulaire, notamment le collagène IV, la fibronectine et les protéines intégrales $\alpha 6\beta 4$ et $\alpha 3\beta 1$. Ces éléments de la matrice extracellulaire sont responsables de l'adhésion et de la migration des cellules épithéliales, ce qui suggère que la nétrine-1 est associée au guidage des cellules épithéliales dans le pancréas embryonnaire[277], [290].

Chez l'adulte, le profil d'expression de la nétrine-1 est moins décrit dans la littérature. Globalement, la nétrine-1 est exprimée à des taux beaucoup plus faibles qu'au cours du développement et présente un profil d'expression assez différent notamment dans le SNC[297]. Ainsi, l'expression de la nétrine-1 au niveau de la plaque du plancher diminue progressivement pour disparaître dès la naissance[280]. Dans la moelle épinière, on la retrouve néanmoins dans certaines populations de neurones (motoneurones, interneurones) et dans les oligodendrocytes qui assurent la myélinisation des axones [298]. La nétrine-1 est également détectée, faiblement, au niveau du cervelet (interneurones) [299] et de quelques populations neuronales du striatum et de la substance noire [300], [301]. Au niveau du SNP, les cellules de Schwann expriment la nétrine-1[302], [303]. La nétrine-1 est faiblement exprimée en-dehors du système nerveux. Les

principaux tissus dans lesquels on a détecté la nétrine sont le sein, le foie, le colon, l'intestin grêle, le cœur, la prostate, les poumons[304] et les ovaires[305].

4.1.2. Les récepteurs à dépendance de la nétrine-1 : DCC et UNC5

Les deux récepteurs principaux décrits pour la nétrine en 1990 sont DCC (deleted in colorectal cancer) et UNC5 (uncoordinated 5). En effet, chez *Caenorhabditis elegans*, comme Unc-6, les gènes Unc-40 et Unc-5 ont également été décrits pour leur implication dans le guidage et la migration axonale. Ces gènes sont trouvés mutés dans plusieurs maladies d'où leur nom « uncoordinated ». En 1990 Hedgecock et ses collègues ont démontré qu'une mutation au niveau des gènes Unc-40 ou Unc-5 affecte la projection ventrale ou dorsale respectivement. Par contre, une mutation du gène Unc-6 avait un impact sur les deux projections[262]. Ceci était la base des études qui suivaient et qui ont identifié Unc-40, Unc-5 et Unc-6, les homologues respectifs de DCC, UNC5 et nétrine-1 chez les vertébrés. Ces trois protéines ont fait l'objet d'une grosse partie des études de recherche portant sur le système nerveux pendant plus de 3 décennies.

Cependant, DCC et UNC5 ne sont pas les seuls récepteurs de la nétrine-1. En effet, la néogénine, A2b, les intégrines $\alpha 6\beta 4$ et $\alpha 3\beta 1$ ainsi que DSCAM (Down's Syndrome Cell Adhesion Molecule) sont également des récepteurs de nétrine-1[295], [306]–[310]. De plus, des nouveaux ligands possibles de UNC5 ont été également identifiés ; des études ont montré que la délétion de UNC5C entraîne plusieurs malformations au niveau du SNC tandis que l'ablation de la nétrine-1 ne cause pas les mêmes aberrations, indiquant la participation d'autres molécules[271], [311].

a- DCC : structure et expression

Deleted in Colorectal Cancer est un récepteur transmembranaire de 1447 acides aminés (190 kDa) également connu sous le nom de DCC, qui, chez l'homme, est codé par le gène DCC. Sa

famille comprend DCC et néogenine [312], [313]. Les études sur DCC ont commencé dès le début des années 90 quand il a été découvert dans une étude sur le cancer colorectal en 1990[314], le DCC a fait l'objet de nombreuses recherches ; il a occupé une place controversée en tant que gène suppresseur de tumeur pendant de nombreuses années et il est bien connu comme récepteur de guidage des axones qui s'active suite à la fixation de la nétrine-1[315]. Récemment, le DCC a été caractérisé comme un récepteur à dépendance, et de nombreuses hypothèses ont ravivé l'intérêt pour sa fonction en tant que gène suppresseur de tumeur, car il peut s'agir d'un suppresseur de tumeur dépendant du ligand qui est souvent sous exprimé.[316]

Le gène DCC est localisé sur le chromosome 18q et produit 29 exons. Ceci, théoriquement, donne 13 différentes variantes de protéines. La protéine DCC est composée de 10 domaines extracellulaires de 1100 acides aminés dont 4 domaines d'immunoglobulines (Ig1, Ig2, Ig3 et Ig4) et 6 domaines de fibronectine III (Fn1, Fn2, Fn3, Fn4, Fn5 et Fn6). Ce long domaine extracellulaire est très conservé et présente des homologies de séquence avec les molécules d'adhésion neuronale de la famille NCAM (Neural Cell Adhesion Molecule). La partie intracellulaire et transmembranaire fait 325 acides aminés et elle est constituée de 3 domaines conservés (P1, P2 et P3) avec un domaine appelé ICD formé de 21 acides aminés, localisé entre P1 et P2. Le domaine ICD est responsable pour l'induction de l'apoptose. De nombreuses études ont essayé de cartographier le site d'interaction de la nétrine-1 avec DCC et ont conclu que la nétrine-1 se lie par ses domaines V et VI aux domaines Fn4 et Fn5 de DCC[317], [318].

Chez l'homme, le DCC se trouve peu exprimé. Il est détecté dans de nombreux tissus adultes et en développement, surtout au niveau du SNC où son expression est maximale. Par conséquence, l'expression de DCC comme la nétrine-1 est retrouvée dans diverses parties du cerveau dont le cortex, le thalamus, le mésencéphale et le cervelet et les systèmes visuels et olfactifs. Au niveau du SNC, le DCC est exprimé au niveau de la commissure antérieure et le corps calleux. L'expression du DCC est dorsale de façon complémentaire à celle de la nétrine-

Il surtout au niveau de la moelle épinière où il participe à l'attraction des axones vers la concentration élevée de nétrine-1[281], [313]. Au niveau du système nerveux périphérique, DCC s'exprime durant les phases précoces du développement de certains ganglions sensoriels, du système nerveux entérique ainsi que dans certains nerfs comme le nerf sciatique[319].

En outre, le DCC se trouve aussi exprimé en dehors du SN, notamment dans l'épithélium de nombreux tissus tels que le tractus digestif, la peau, les poumons, la vessie et la prostate[276], [320]. Chez l'adulte, l'expression du DCC est relativement faible mais ubiquitaire[321], [322], mais avec un taux d'expression plus important dans les zones où subsiste une neurogenèse[323].

b- UNC5 : structure et expression

La famille UNC5 comprend quatre membres : UNC5H1 à 4 chez les rongeurs et UNC5A, B, C et D chez l'homme [324]–[326]. Chez l'homme, ils sont codés par les gènes localisés au niveau des chromosomes 5q35.2, 10q22.1, 4q21-23 et 8p12 respectivement[327]. Ce sont également des récepteurs de guidage neuronal dotés de fonctions supplémentaires en dehors du système nerveux.

Les récepteurs UNC5 sont des récepteurs transmembranaires de type I et d'un poids moléculaire d'environ 110kDa. En 1997, les travaux de Leonardo et ses collègues ont mené à l'exploration de deux protéines de rat homologues de UNC-5 ; UNC5H1 et UNC5H2. Les protéines découvertes présentent une similitude de séquence avec UNC-5 sur toute la longueur, mais sont plus similaires entre elles (52% d'identité) qu'à UNC-5 (28% d'identité dans chaque cas). Comme UNC-5, le domaine extracellulaire des deux protéines UNC5H1 et UNC5H2 ont deux domaines de type immunoglobuline et deux répétitions de thrombospondine de type 1, une région couvrant la membrane et un grand domaine intracellulaire. Les protéines UNC5H possèdent également chacune une séquence de signalisation qui n'existe pas dans UNC-5. La topologie prédite par Leonardo et al. en 1997 des protéines UNC5H a été vérifiée en utilisant des anticorps dirigés contre les domaines extracellulaires et intracellulaires des versions

recombinantes des protéines exprimées dans des cellules transfectées. La région extracellulaire contient deux domaines de type immunoglobuline (Ig1 et Ig2) et deux domaines thrombospondine de type I (TSP1 et TSP2). Les domaines cytoplasmiques des deux protéines UNC5H ne contiennent pas de motifs de signalisation répandus, ce qui n'a pas aidé à identifier les domaines intracellulaires. Seule une petite région d'homologie avec Zona Occludens-1 (ZO-1 ; une protéine qui se localise aux jonctions adhérentes et elle est impliquée dans la formation des jonctions) a été identifiée [328], [329]. Il s'est théorisé que ces fragments intracellulaires de ressemblance entre UNC5 et la partie c-terminale de ZO-1 aident à l'interaction de la partie intracellulaire du récepteur avec le cytosquelette de la cellule d'où le rôle de UNC5 dans l'attraction, la répulsion et la migration cellulaire[330]. Durant la même année, Ackerman et ses collègues ont découverts une troisième protéine similaire aux deux protéines UNC5H1 et UNC5H2[325]. Cette protéine était le troisième homologue de UNC-5 appelé aussi UNC5H3 ou UNC5C. La quatrième protéine de cette famille, UNC5H4 ou UNC5D, a été identifiée en 2002 par Dieter Engelkamp. Il a également démontré la similarité entre ces 4 protéines en alignant les séquences d'acides aminés relatives à chacune d'entre elles[331]. Finalement, en 2009, les structures cristallographiées par Wang et ses collègues ont identifié deux autres domaines intracellulaires de ces protéines, qui s'ajoutent au domaine nommé ZU-5 (fragment semblable à ZO-1). Ces deux domaines sont UPA (Unc-Pidd-Ankyrins) et DD (Death Domain). Le domaine UPA est commun aux protéines UNC5, PIDD et Ankyrin et contient une séquence d'interaction avec le domaine P3 de DCC appelée DB (DCC Binding). Enfin, un domaine de mort DD, homologue à celui des récepteurs de mort classiques de la famille du TNF est présent au niveau C-terminal[332]. La nétrine-1 se lie via ses domaines V et C aux deux domaines immunoglobulines de la partie extracellulaire des récepteurs UNC5[317], [318], [333].

L'expression des récepteurs de la famille UNC5 est aussi liée au développement du système nerveux central mettant en jeu la nétrine-1[334], [335]. Au cours du développement, UNC5A

et B sont exprimés au niveau de la moelle épinière, dans les motoneurones ventraux et dans les ganglions sensoriels dorsaux respectivement[326]. Ces deux récepteurs sont aussi exprimés dans le cervelet et le cortex en cours de développement[331]. UNC5A est nécessaire au développement de la moelle épinière. En effet, sa délétion chez la souris altère sa morphologie par manque d'apoptose entraînant l'augmentation du nombre de certains motoneurones[336]. La délétion de UNC5B est létale au cours du développement en raison de l'incapacité de formation des vaisseaux sanguins, par voie de novo, ce qui empêche l'étude de sa fonction au niveau du SNC[294]. De plus, certaines études ont montré que UNC5B est également exprimé dans les neurones corticaux et hippocampiques [337] et dans les cellules de Schwann[338], [339]. UNC5C semble être fortement exprimé dans le cervelet. Son invalidation n'est pas létale dans tous les cas. Ackerman et ses collègues ont démontré qu'une mutation spontanée qui touche l'exon 13 du produit de ce gène cause une atrophie du cervelet causée par une mauvaise migration des cellules granulaires[325]. Les souris qui possèdent une telle malformation portent le nom de souris rcm (rostral cerebellar malformation) et présentent une perte de coordination des mouvements. Des études ont expliqué ce phénomène par les défauts lors de la migration des cellules granulaires, ce qui ne permet plus de reconnaître la limite rostrale du cervelet[340]–[342]. Finalement, UNC5D joue un rôle essentiel dans le cortex somatosensoriel et le centre de vision et conditionne la survie des cellules corticales par sa dépendance à la nétrine-1[335], [343].

Au cours du développement UNC5B, C et D sont exprimés dans plusieurs organes en dehors du système nerveux tels que les poumons, les bourgeons des membres, les yeux et les vaisseaux sanguins tandis que l'expression de UNC5A reste exclusive au système nerveux central[331], [344].

4.1.3. Signalisation des récepteurs DCC et UNC5 en présence de nétrine-1

Suite à leur liaison à la nétrine-1, les deux récepteurs DCC et UNC5 induisent des voies de signalisation connues pour leur implication dans le guidage axonal. Toutes les cellules du système nerveux qui possèdent un axone s'orientent dans leur environnement grâce à une structure spécialisée appelée cône de croissance qui amène l'axone, grâce aux voies de signalisation déclenchées suite aux interactions récepteur/ligand, vers sa cible finale. L'axone est capable d'accomplir cette tâche grâce à son cytosquelette sous-jacent formé essentiellement d'actine et de microtubules qui subit un remodelage et exécute la réponse appropriée[276], [345], [346].

Les études qui caractérisent les voies de signalisation induites par DCC sont beaucoup plus nombreuses que celles qui décrivent les voies de signalisation de UNC5. Brièvement, en présence de nétrine-1, l'homodimérisation de DCC induit un signal d'attraction[347]. Par contre, les récepteurs de la famille UNC5 assurent la répulsion qui nécessite la signalisation via des hétérodimères des récepteurs UNC5-DCC ou des homodimères des récepteurs UNC5[262], [294], [348], [349].

a- Signalisation induite par DCC

La fixation de la nétrine-1 à DCC induit sa dimérisation via son domaine intracellulaire P3[307], [318], [350], [351]. Cette dimérisation, voir multimérisation, par les multiples domaines de liaison de la nétrine-1 à DCC[351]–[353] est davantage favorisée suite à la formation du radeau lipidique, essentiel pour cette signalisation, grâce aux interactions des micro-domaines membranaires[353]–[357]. Ce réarrangement de conformation va permettre par suite à DCC d'interagir avec de nombreuses protéines intracellulaires telles que la protéine adaptatrice Nck1 (non catalytic region of tyrosine kinase adaptor protein), les protéines à activité tyrosine kinase FAK et Fyn, la protéine kinase sérine-thréonine Pak1 (p21-activating kinase 1), ainsi que les protéines de liaison à l'actine Ena/Vasp et N-WASP (neuronal Wiskott-

Aldrich Syndrome protein). Le recrutement de celles-ci conduit alors à l'activation de plusieurs voies de signalisations, parmi lesquelles la voie des Rho GTPases impliquant Cdc42 et Rac1, la voie des seconds messagers dans laquelle intervient l'AMPc, l'GMPc et le calcium; et celle des MAPK[358]. (Figure 5)

Les Rho GTPases appartiennent à une famille de protéines qui jouent un rôle dans l'organisation du cytosquelette et les interactions adhésives. Ces protéines se trouvent sous deux formes, et bascule constamment entre les deux. Ainsi, elles sont soit sous forme active liée au GTP, soit sous forme inactive liée au GDP. Cette oscillation entre les deux formes est assurée grâce à deux protéines enzymatiques ; GEFS (Guanine nucleotide Exchange Factors) qui favorisent l'échange de GDP pour du GTP et les GAPS (GTPase activating proteins) qui stimulent l'activité GTPase donc une inactivation des Rho GTPases[276]. L'activité des Rho-GTPases est régulée également par un complexe contenant différentes protéines dont Pak-1 et N-WASP[358]. Les protéines à activité tyrosine kinase de la famille Src (Src, Fyn) et FAK qui interagissent avec DCC respectivement au niveau de ses domaines P2 et P3 pourraient aussi activer les Rho-GTPases telles que Rac1 et cdc42. En effet, la fixation de nétrine-1 sur DCC induit la phosphorylation des protéines DCC, FAK et Fyn ce qui active Rac1 et cdc42 via la phosphorylation de la protéine p130CAS[359], [360]. L'activation de Rac1 et cdc42 induit respectivement une augmentation de la surface cellulaire et du nombre de filopodes nécessaires à la motilité du cône de croissance. De plus, en présence de nétrine-1, la RhoA (Ras homologous member-A) est inhibée, ce qui favorise la croissance axonale[361], [362]. (Figure 5)

La réponse du cône de croissance à différentes molécules de guidage dont la nétrine-1 est régulée par les taux intracellulaires de seconds messagers comme l'AMP cyclique, le GMP cyclique ou le calcium (Ca^{2+}). Dans le cône de croissance, la concentration en Ca^{2+} est conditionnée par le ratio AMPc/GMPc. L'augmentation de ce ratio induit l'attraction du cône, et sa diminution induit la répulsion. La liaison de la nétrine-1 à DCC induit la production

d'AMPc et donc l'augmentation du ratio AMPc/GMPc engendrant ainsi l'entrée de Ca²⁺ intracellulaire via les canaux à calcium de type L, ce qui favorise la croissance des cônes et l'attraction axonale[363]–[366]. Au niveau des axones embryonnaires, la nétrine-1, via DCC, activerait une Adénylate Cyclase soluble (ACS) capable de produire de l'AMPc et engendrant une activation de la protéine kinase A (PKA) elle-même à l'origine de l'activation des canaux à calcium qui transportent le Ca²⁺ dans la cellule et induisent l'attraction[367], [368]. (Figure 5)

Enfin, en présence de nétrine-1, les MAPK telles que ERK1/2 sont recrutées au niveau du domaine intracellulaire de DCC, ce qui induit leur phosphorylation par MEK1/2, des MAPK kinases qui interagissent avec DCC pour induire l'attraction[369]. P38 est une autre MAPK activée par phosphorylation. Elle collabore avec les MAPK ERK1/2 et également induit une activation locale de la caspase-3, requise par exemple pour la réponse d'axones rétiniens de xénope à la nétrine-1, et pour le remodelage local du cytosquelette[370]. (Figure 5)

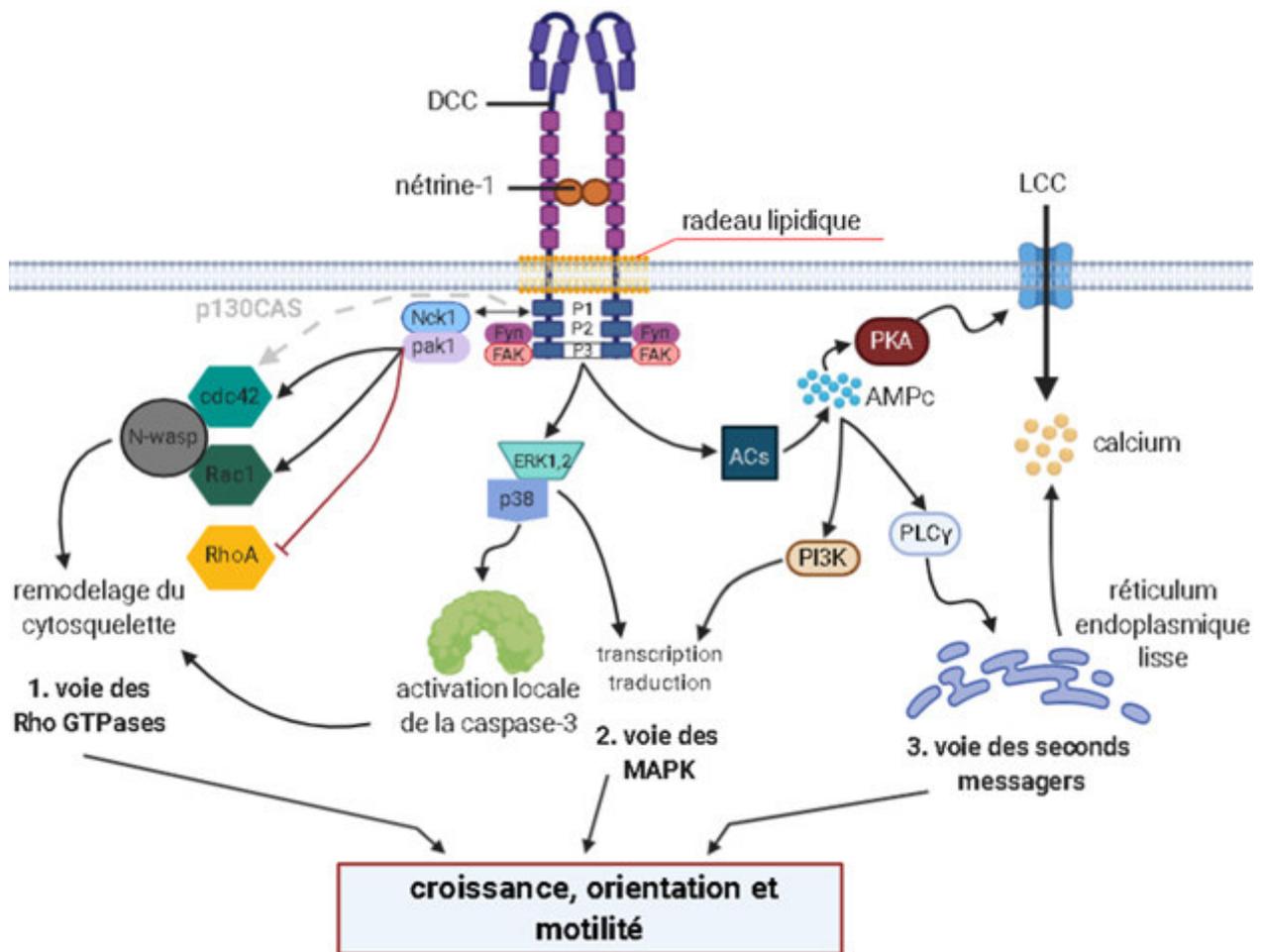


Figure 5 : signalisation positive de DCC en présence de nétrine-1.

La fixation de nétrine-1 sur DCC induit la dimérisation/multimérisation du récepteur par son domaine P3, en formant des radeaux lipidiques sur la membrane. Ensuite, DCC active plusieurs voies de signalisation aboutissant au remodelage du cytosquelette régulant notamment la croissance, l'orientation et la motilité (des axones et des dendrites du SNC). L'ensemble de ces voies permettrait notamment d'assurer la motilité du cône de croissance des neurones vers sa cible.

Fyn : Proto-oncogene tyrosine-protein kinase. FAK : focal adhesion kinase. Nck1 : Cytoplasmic protein NCK1. Pak1 : Serine/threonine-protein kinase PAK 1. Cdc42 : Cell division control protein 42 homolog. Rac1 : Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1.

RhoA : Ras homolog family member A. N-wasp : Wiskott–Aldrich Syndrome protein.

ERK1,2 : extracellular signal-regulated kinases. P38 : mitogen-activated protein kinases.

ACS : adenylyl cyclases. PI3K : Phosphoinositide 3-kinases. PLCγ : Phospholipase C gamma.

PKA : protein kinase A.

b- Signalisation induite par UNC5

Comme évoqué précédemment, les récepteurs UNC5 induisent la répulsion des axones soit par une homodimérisation ou plus communément par une hétérodimérisation avec un récepteur DCC[299], [348]. Leur implication dans la chimiorégulation de la croissance axonale et vasculaire est moins décrite que DCC[348]. En effet UNC5A, B et C sont capables de lier la nétrine-1 par leurs domaines immunoglobulines avec des affinités différentes. UNC5B possède la plus basse constante de dissociation pour sa liaison à la nétrine-1 donc c'est le complexe le plus stable et favorable suivi par UNC5C et finalement UNC5A[326]. Malgré la rareté des cas dans lesquels UNC5 peut repousser les neurones par son homodimérisation, quelques études ont décrit certains cas dans lesquels UNC5 peut agir seul durant le phénomène de répulsion. Masuda et ses collègues ont démontré que les axones DRG de la souris exprimant UNC5C seulement, sont repoussés par la nétrine-1[371]. La répulsion des axones par hétérodimérisation de DCC avec UNC5 est mieux connue. L'étude réalisée au sein de l'équipe de Elke Stein en 1999 a démontré que l'attraction initiée par DCC peut être convertie en répulsion lors de la surexpression de UNC5B dans les neurones exprimant DCC. En effet, la nétrine-1 présente dans l'environnement de la cellule exprimant UNC5B induit un rapprochement d'un récepteur UNC5B avec un récepteur DCC en s'accrochant de part et d'autre à leurs domaines extracellulaires. Suite à cette liaison, le domaine intracellulaire P1 de DCC interagit avec le domaine intracellulaire DB de UNC5B et par conséquent convertit l'attraction en répulsion. La liaison de la nétrine-1 à l'hétérodimère DCC/UNC5 diminue le ratio AMPc/GMPc [367], [368] qui selon le mécanisme décrit dans la signalisation de DCC doit induire nécessairement une répulsion du cône de croissance.

Quant à l'homodimérisation de UNC5, elle induit la répulsion évidemment à travers d'un processus différent. La liaison de la nétrine-1 aux récepteurs UNC5 homodimérisés induit la phosphorylation de leur domaine intracellulaire ZU5 souvent par des tyrosine kinases comme

la Src1[372]. Cette étape initiale est essentielle au recrutement d'autres protéines de signalisation. Lors de l'étude du cas de l'homodimérisation de UNC5C, les études ont démontré que la tyrosine phosphatase Shp2 est recrutée pour interagir ainsi avec des GTPases de la famille Rho ce qui réorganise le cytosquelette[373]. Des mutations au niveau des domaines intracellulaires phosphorylés lors de l'activation de UNC5 causent une perturbation dans le guidage axonal des motoneurones chez *C. elegans*[374]. Plusieurs GTPase ont été identifiées comme acteurs essentiels dans cette voie de signalisation parmi lesquels on trouve Gi-alpha2 et PIKE-L[337], [375].

UNC5A interagit d'une autre façon avec les protéines intracellulaires. En effet, suite à la liaison de la nétrine-1 sur ce récepteur la protéine kinase C et la PICK1 sont recrutés et induisent l'internalisation de ce récepteur ce qui diminue sa capacité à rétracter les cônes de croissance des cellules hippocampiques mais à l'inverse ce phénomène est inversé en une attraction[376], [377].

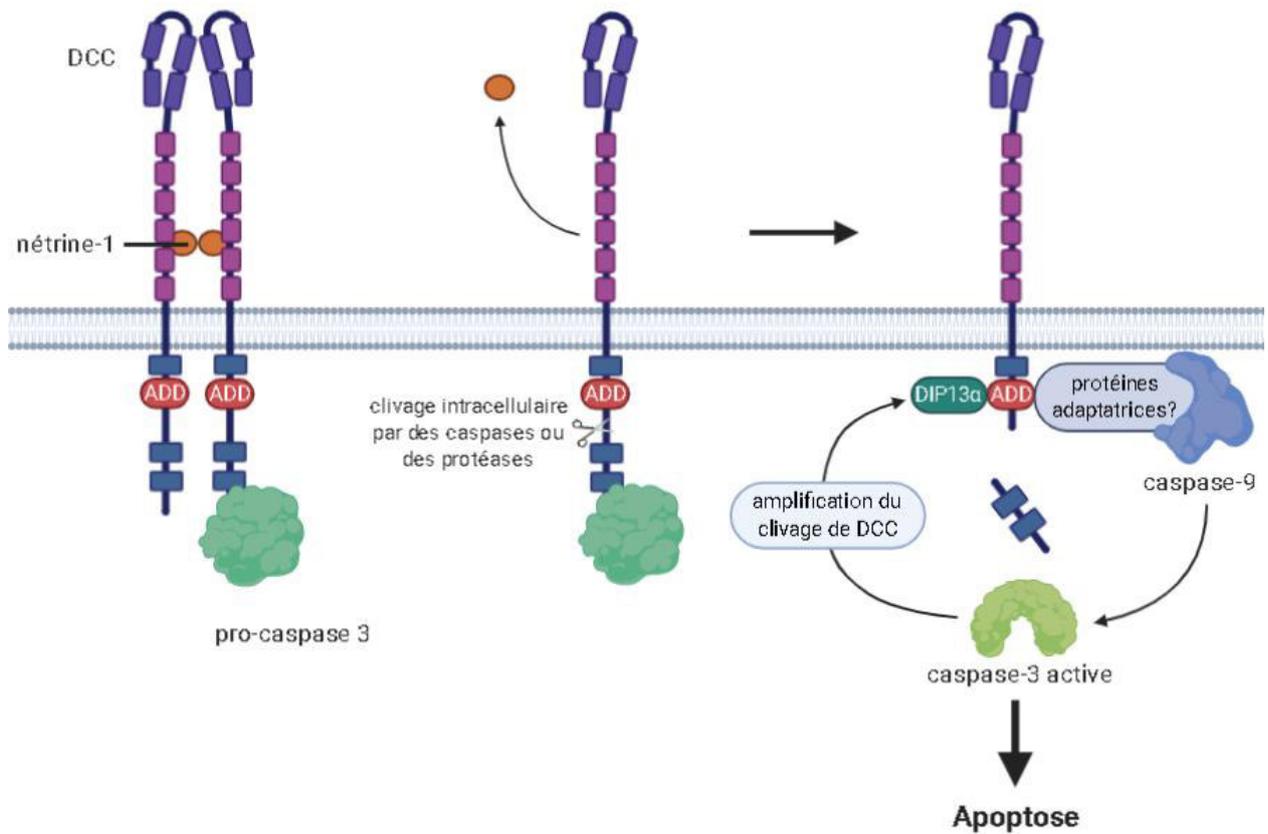


Figure 6 : induction de l'apoptose par le récepteur DCC.

En présence de nétrine-1, le récepteur DCC est dimérique/multimérique, et son domaine intracellulaire interagit avec la caspase-3. Quand la nétrine-1 se détache du récepteur, DCC est clivé au niveau du résidu D1290 par des protéases de type caspase (ou d'autres protéases). Cette étape permet l'exposition de son domaine ADD (Addiction Dependence Domain) et des partenaires pro-apoptotiques intracellulaires sont ainsi recrutés comme la DIP13 α et la caspase-9. La caspase-9 est alors activée ce qui résulte en une activation de la caspase-3 et induit potentiellement une amplification du clivage des autres récepteurs DCC, aboutissant à l'induction de la mort cellulaire par apoptose.

4.1.4. Signalisation de DCC et de UNC5 en absence de la nétrine-1 : récepteurs à dépendance.

Au contraire des récepteurs classiques, un récepteur à dépendance est un récepteur capable d'induire une voie de signalisation intracellulaire même en absence de son ligand. Cette voie de signalisation amène souvent à l'apoptose d'où sa nomenclature.

Ce concept a été identifié par Patrick Mehlen et Dale Bredesen en 1998 durant une étude *in vitro* impliquant le couple nétrine-1/DCC[378]. Il a été également démontré que la famille des récepteurs UNC5 agit aussi comme récepteurs à dépendance[379]–[381]. En tant que récepteurs à dépendance, les récepteurs DCC et UNC5 ne sont pas inactifs en absence de nétrine-1 mais induisent un signal d'apoptose[378]. Pour faire cela, plusieurs acteurs cytoplasmiques s'engagent parmi lesquels un petit nombre est déjà connu. Quant aux voies de signalisation, une variété est proposée mais en général elles restent toujours à l'état d'ébauche. La littérature a décrit auparavant quelques phénomènes nécessaires à l'induction de l'apoptose par DCC et UNC5B en absence de nétrine-1 parmi lesquels on cite : (1) La localisation des récepteurs dans les radeaux lipidiques (les micro-domaines membranaires faisant office de plateforme de signalisation)[355], [382] ; (2) un état de monomérisation[350] ; (3) le clivage de leur domaine intracellulaire par des protéases de type caspase conduisant à l'exposition d'un domaine pro-apoptotique appelé ADD (Addiction e Domain)[378] ; et finalement (4) le recrutement de plusieurs protéines pro-apoptotiques (de différentes natures selon DCC ou UNC5) qui forment un complexe d'activation des caspases effectrices, dont la caspase-3, et aboutit à la mort de la cellule[350].

a- Induction d'apoptose via DCC

En absence de nétrine-1, la caspase-3 clive le domaine intracellulaire de DCC *in vitro*. Le domaine de mort ADD a été bien cartographié en amont du site de clivage par la caspase-3. ADD correspond aux acides aminés 1243 à 1264. Il a été aussi démontré que le résidu Asp1290

est le point précis où la caspase-3 agit. En effet, la mutation du site de clivage, l'ajout d'un inhibiteur de caspase ou la délétion du domaine ADD de DCC abolit sa capacité d'induire l'apoptose[378].

Parmi les protéines pro-apoptotiques recrutées durant ce processus, 3 ont été identifiées : les caspases-3 et 9 et la protéine DIP13 α (DCC interacting protein 13alpha). En présence de nétrine-1, la caspase-3 interagit avec le domaine intracellulaire de DCC, en aval de son site de clivage. Par contre la caspase-9 interagit de manière indirecte avec DCC via le domaine ADD, et n'est pas détectée qu'en absence de nétrine-1 ou après clivage initial du récepteur. Bien que l'apoptose induite par DCC fasse appel aux caspases, les études montrent que DCC n'emprunte pas la voie canonique des caspases, puisque les protéines effectrices de la voie mitochondriale (Bcl-2, Apaf-1, cytochrome c) ou de la voie des récepteurs de mort (caspase-8) n'influent pas l'apoptose induite par DCC[383]. Une interaction entre la protéine DIP13 α et le domaine ADD de DCC a également été observée mais on connaît peu jusqu'à présent sur l'effet de cette interaction et son rôle précis dans l'apoptose malgré qu'il a été prouvé que l'expression de DIP13 α et son interaction avec le domaine ADD de DCC sont requises pour l'activité pro-apoptotique[384]. Il est possible que DIP13 α soit la protéine qui recrute la caspase-9 mais ceci n'était pas démontré. (Figure 6)

En conclusion, le bilan suggéré est un modèle selon lequel DCC interagit en même temps, d'une part, par son domaine extracellulaire avec la nétrine-1 durant sa présence dans le microenvironnement de la cellule et d'autre part, par son domaine intracellulaire avec la caspase-3 mais en empêchant l'activation de cette dernière à travers son homodimérisation. Le changement de conformation de DCC et sa localisation dans les radeaux lipidiques en absence de nétrine-1, permettent son clivage par la caspase-3 et l'exposition de son domaine ADD sur lequel les protéines DIP13 α et caspase-9 sont recrutées. Ce phénomène déclenche une cascade de caspase-3 liées à DCC ou libres ce qui amplifie le signal apoptotique.

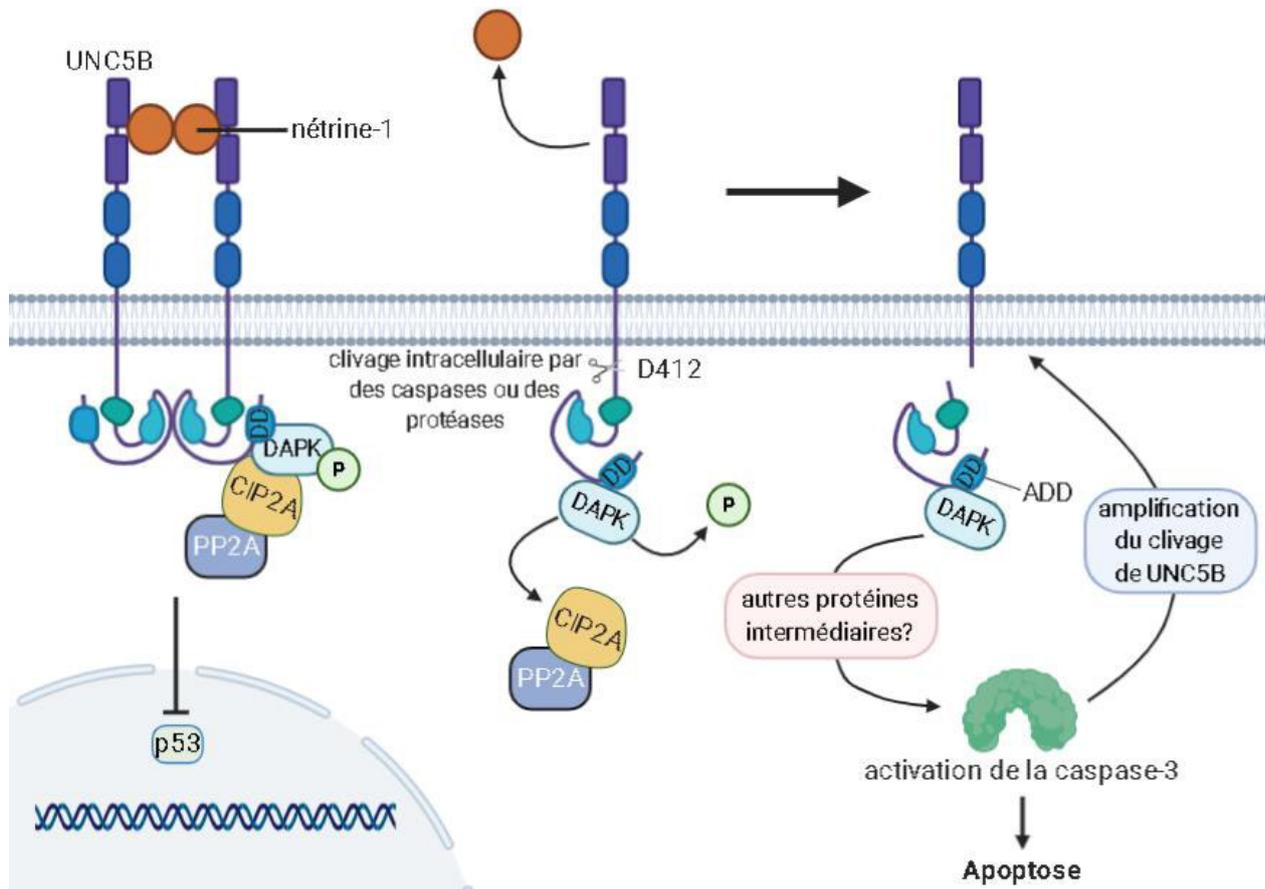


Figure 7 : signalisation du récepteur UNC5B.

En présence de nétrine-1, le récepteur UNC5B est dimérique/multimérique, grâce à l'interaction des domaines ZU5, UPA et DD. La DAPK associée à UNC5B est phosphorylée et inactive. En absence de nétrine-1, UNC5B est clivé par des protéases de type caspase (ou d'autres protéases) au niveau du résidu D412. Le module formé par les domaines ZU5/UPA/DD passe en conformation ouverte, ce qui est accompagné de la déphosphorylation de la DAPK qui devient active. Le domaine ADD (Addiction Dependence Domain) de UNC5B représentant son domaine de mort (DD) est associé à la DAPK induit une activation de la caspase-3. Celle-ci peut cliver d'autres récepteurs UNC5B amplifiant ainsi le signal, et conduit à l'induction de la mort cellulaire par apoptose.

b- Induction d'apoptose via UNC5

Le domaine intracellulaire des récepteurs UNC5 est également clivé par la caspase-3[380], [385], [386] *in vitro* au niveau de l'acide aspartique Asp412 pour UNC5B. Ce site de clivage est aussi conservé dans UNC5A et UNC5C. Ce site de clivage est situé entre le domaine ZU-5 et le domaine transmembranaire du récepteur. Son clivage par des protéases ou des caspases libère donc toute la partie intracellulaire du récepteur qui comporte les trois domaines ZU-5, UPA et DD. Différemment à DCC, c'est le fragment libéré dans le cytoplasme qui est l'origine de l'activité apoptotique des récepteurs UNC5[380]. Dans le cas de UNC5B, seul le domaine de mort est nécessaire à l'activité apoptotique du récepteur. Pour UNC5A, il a été démontré que toute la partie intracellulaire est nécessaire pour abolir son activité apoptotique. Quant à UNC5C, une étude a démontré à travers une mutation au niveau du résidu Thr835, qui déclenchait l'apoptose des neurones, l'emplacement approximatif du domaine de mort[387] qui était confirmé après entre les résidus Ile844 et Ala926. Le domaine de mort de UNC5D se situe entre les résidus Ile853 et Gln950[332]. Les variations minimales au niveau de la composition des domaines ADD chez les différents UNC5 pourraient expliquer l'interaction avec différentes protéines intracellulaires afin de déclencher l'apoptose.

Dans la voie induite par UNC5A, la protéine NRAGE de la famille MAGE (Melanoma Associated Antigens) interagit spécifiquement avec UNC5A[388]. Ceci est dû, dans le cas de UNC5A, à la présence de la séquence PEST sous-membranaire proche du domaine ZU-5 avec lesquels NRAGE interagit. De plus, l'expression de NRAGE est nécessaire à l'activité pro-apoptotique de UNC5A. NRAGE a été décrit comme un régulateur de la transcription mais aussi de l'apoptose[389]. Cette protéine induit l'apoptose en interagissant avec UNC5A de deux façons : à travers (1) la dégradation de la protéine inhibitrice de l'apoptose XIAP[390]; et (2) l'activation de la voie de signalisation de la kinase c-Jun aboutissant à l'activation des caspases[391].

En absence de nétrine-1, le récepteur UNC5B subit un changement de conformation, autorisant son clivage sous-membranaire par des protéases de type caspase. Le domaine intracellulaire de UNC5B adopte une conformation ouverte, qui pourrait être liée à la phosphorylation de certains de ses résidus, ce qui permet à la DAPK1 d'interagir avec le DD et d'être déphosphorylée. La DAPK1 (Death Associated Protein Kinase 1) interagit avec UNC5B et est nécessaire à son activité apoptotique[386]. Elle est une protéine intracellulaire, qui possède une activité sérine thréonine kinase, impliquée dans l'induction de la mort cellulaire suite à l'accumulation des signaux apoptotiques et possède aussi un domaine de mort très proche de celui de UNC5B nécessaire à la mort induite par cette kinase. De plus, l'autophosphorylation de la DAPK1, au niveau de la sérine 308, la maintient sous une forme inactive. F. Llambi et ses collaborateurs ont montré que la DAPK1 interagissait avec UNC5B via leurs domaines de mort respectifs, de façon constitutive. En présence de nétrine-1, la DAPK1 phosphorylée est donc inactive. En absence de nétrine-1, la DAPK1 est déphosphorylée et donc activée, une étape qui requiert le clivage intracellulaire de UNC5B[381]. Les travaux de Céline Guenebeaud, au sein de l'équipe de Patrick Mehlen, ont permis de démontrer qu'en absence de nétrine-1, la protéine phosphatase 2A (PP2A) est recrutée au niveau du complexe UNC5B/DAPK1, permettant alors la déphosphorylation de la DAPK1[392]. En présence de nétrine-1, le récepteur UNC5B est dimérique et son domaine intracellulaire adopte une conformation fermée qui interagit avec la DAPK1 phosphorylée. Egalement, l'activité phosphatase de PP2A est bloquée par le recrutement de CIP2A, bloquant ainsi la DAPK1 et l'induction de l'apoptose. Comme pour DCC, le récepteur UNC5B doit également être localisé dans les radeaux lipidiques pour induire l'apoptose[382]. (Figure 7)

UNC5C activerait l'expression de DAPK1, qui a son tour activerait séquentiellement PKD, ASK1, JNK, NADPH oxydase et enfin les caspases et conduirait finalement à une apoptose[393]. Les voies Vps34 induites par DAPK1 peuvent également être une voie possible

pour déclencher une autophagie[394]. De plus, le DAPK1 activé pourrait phosphoryler APP à Thr668, ce qui entraînerait la mort par agrégation de la protéine β -amyloïde induisant la voie ASK1/caspase-3[393]. D'un autre côté, l'UNC5C peut également être lié à la voie associée à NRAGE. Le NRAGE aberrant peut activer JNK, ce qui conduirait finalement à la mort dépendante des caspases. De plus, le NRAGE peut également dégrader l'inhibiteur de caspase XIAP, ce qui déclencherait l'augmentation des caspases et entraînerait une apoptose neuronale[388].

Finalement, UNC5D est régulé par le gène p53 suppresseur de tumeur. Il induit la voie de signalisation menant à l'apoptose induite par p53. Ce processus peut être inversé par la liaison de la nétrine-1 à ce récepteur[386], [395]. Le clivage de la caspase par UNC5H4/D libère un fragment intracellulaire qui se déplace dans le noyau et interagit avec le facteur de transcription E2F1 pour transformer sélectivement les gènes cibles[386].

4.1.5. Expression et rôle de nétrine-1 et ses récepteurs dans les cancers.

Chez l'adulte, l'expression des récepteurs à dépendance DCC et UNC5 est faible mais relativement ubiquitaire. La délétion de la nétrine-1 chez les souris est létale ce qui complique l'étude des fonctions de la nétrine-1 chez l'adulte[281]. Pourtant, certaines études suggèrent un rôle de la nétrine-1 au cours de situations particulières comme par exemple l'inflammation en condition hypoxique[396]. Ainsi, le concept des récepteurs à dépendance, et leur pouvoir de vie ou de mort sur la cellule, permet d'envisager leur rôle dans le maintien de l'homéostasie tissulaire et dans la surveillance antitumorale. Comme tout mécanisme de sauvegarde, le contournement de l'apoptose induite par ces récepteurs à dépendance constituerait alors un avantage sélectif pour les cellules tumorales. A toutes ces propriétés s'ajoute récemment la mise en relief de l'importance de la dérégulation de l'expression de ces protéines dans les cancers. Les études se sont concentrées sur l'exploration de la double fonction de ces protéines qui se présente par pro et anti-tumorale selon leur expression dans les tissus.

a- Régulation de l'expression de la nétrine-1 dans les cancers

A l'heure actuelle, plusieurs études ont analysé l'expression de la nétrine-1 au sein d'échantillons tumoraux provenant des patients. Certaines ont montré une perte d'expression de nétrine-1 comme dans les tumeurs de la prostate [322]. Pourtant, la majorité des études réalisées montrent plutôt une augmentation de l'expression de la nétrine-1 dans les différents types tumoraux tels que le cancer colorectal[397]–[399], les cancers du sein métastatiques[400], le cancer du poumon[401] et le neuroblastome[402].

En 2008, Fitamant et ses collègues ont pu démontrer, que le niveau d'expression de nétrine-1 est corrélé au stade de propagation d'un panel de tumeurs mammaires. Ainsi, 63% des tumeurs métastasées dans au-delà des ganglions avait un taux d'expression de nétrine-1 cinq fois supérieur au taux d'expression trouvé dans les tumeurs non métastasées contre 32% dans les tumeurs propagées seulement dans les ganglions. Ils ont également démontré, dans un modèle syngénique *in vivo* qu'ils ont développé, que les cellules de la lignée 4T1 de cancer mammaire murin exprimant la nétrine-1 sont plus métastatiques que celles n'exprimant pas la nétrine-1[400], [403]. Suite à ces résultats, un peptide correspondant au cinquième domaine fibronectine III de DCC a été synthétisé afin de bloquer l'interaction de la nétrine-1 avec ces récepteurs. L'utilisation de ce peptide *in vitro* induisait l'apoptose dans plusieurs lignées de cancer mammaire murines et humaines exprimant la nétrine-1[350]. Egalement, le traitement avec ce peptide réduisait la métastase des tumeurs 4T1 chez les souris *in vivo*.

D'ailleurs, un certain nombre d'études a démontré la surexpression de la nétrine-1 dans plusieurs types de cancer tel que le carcinome pulmonaire non à petites cellules et les neuroblastomes dans leurs stades les plus agressifs. Dans le cas du carcinome pulmonaire non à petites cellules et certains neuroblastomes, il a été démontré que la production de la nétrine-1 se fait non seulement par voie paracrine mais aussi par voie autocrine et ceci d'une manière constitutive ce qui bloque le signal de mort des récepteurs à nétrine-1[401], [402]. Il faut noter

que dans ce type de tumeur aucune corrélation entre le niveau d'expression de nétrine-1 et le pronostic des patient n'a été trouvée[401]. Par contre, dans les neuroblastomes du nourrisson, le taux d'expression de nétrine-1 est associé à un mauvais pronostic[402]. Dans certaines lignées cellulaires, il a été démontré que le déclenchement de l'apoptose dépend spécifiquement d'un récepteur à nétrine-1 mais pas d'un autre. Ceci est le cas de la lignées H358 dans laquelle l'apoptose dépend spécifiquement de UNC5A et UNC5B.

En 2010, Dumartin et ces collègues ont démontré que la nétrine-1 joue un rôle important dans l'invasion des cellules tumorales dans le cancer pancréatique. Ceci a été vérifié quand l'analyse de l'expression de la nétrine-1 des cellules tumorales pancréatiques humaines greffées sur la membrane chorioallantoïde d'embryons de poulet montrait une augmentation de l'expression de nétrine-1 dans les cellules tumorales en phase d'invasion par rapport au cellules non-invasives[404]. En même temps l'analyse d'un panel de tumeurs pancréatiques humaines a permis d'observer une augmentation de l'expression de nétrine-1 par rapport aux tissus sains. Ceci montrait que la surexpression de nétrine-1 caractérise certaines tumeurs humaines métastatiques et elle est un facteur significatif qui influence la capacité invasive des cellules tumorales. Il est suggéré que dans le cas des cancers colorectaux inflammatoires, l'activation du gène de la nétrine-1 est réalisé par NF- κ B.[405] Pourtant une étude a montré que le gène de nétrine-1 peut être aussi surexprimé sous l'action de p53 après traitement des cellules cancéreuses par des agents chimiothérapeutiques cytotoxiques[406].

La nétrine-1 joue également un rôle dans la progression tumorale notamment au niveau de l'angiogenèse. Quoique son implication a été démontrée en tant que molécule vitale pour la prolifération des réseaux vasculaires, le rôle de la nétrine-1 en tant que facteur pro-angiogénique ou anti-angiogénique est toujours en débat. De nombreuses études ont révélé des effets différents de la nétrine-1 sur ces vaisseaux ramifiés. Les cellules de l'extrémité endothéliale du tissu vasculaire présentent des propriétés similaires à celles du cône de croissance présent dans

le tissu neuronal. En effet, des études ont montré que ces mêmes cellules à l'extrémité endothéliale expriment également UNC5B, auquel la nétrine-1 peut se lier, inhibant l'angiogenèse. En revanche, plusieurs études montrent que la nétrine-1 favorise réellement la ramification des vaisseaux sanguins[289], [296], [407]. Globalement, ces études montrent que les effets régulateurs de la nétrine-1 dépendent du type de tissu vasculaire.

b- Rôle de DCC dans la carcinogenèse et la progression tumorale

Depuis le début des années 90, un grand nombre d'études décrivaient la régulation de DCC dans les cancers. Les premières études sur les tumeurs colorectales ont révélé que des suppressions alléliques de segments du chromosome 18q se produisent dans un pourcentage très élevé de cancers colorectaux. Parmi ces études, Fearon et ses collègues mettaient en évidence la perte de ces fragments, y compris le gène DCC, dans 70% des cancers colorectaux d'où le nom donné à ce récepteur[314], [408], [409]. Ensuite, plusieurs études ont pu associer la perte du chromosome 18q avec une diminution de l'expression de DCC[410], [411] qui a été ensuite corrélée avec la fréquence des lésions tumorales colorectales ce qui suggérait un rôle tardif de DCC sur l'initiation tumorale mais également sur la progression de la tumeur[412], [413]. De même, la perte du chromosome 18q a été trouvée corrélée au stade de différents cancers. En effet, cette perte est rare dans les adénomes de bas grade mais elle est présente dans plus de 70% des carcinomes et retrouvée dans la totalité des métastases hépatiques d'origine colorectale ce qui fait de ce phénomène génétique un facteur de mauvais pronostic et un facteur favorable pour le développement des métastases[414], [415].

D'ailleurs, une perte d'hétérozygotie du chromosome 18q et une expression réduite de DCC ont été décrites dans de nombreux cancers (prostate, ovaires, estomac, cancers hématologiques...)[416]. La régulation négative de DCC dans les cancers a été reliée à différents phénomènes génétiques et/ou épigénétiques. Ceci peut impliquer l'hyperméthylation du promoteur, ou dans d'autres cas l'expansion nucléotidique après l'exon 7 qui engendre une

diminution de la quantité des transcrits[314]. A cela s'ajoute quelques rares délétions homozygotes de fragments de DCC répertoriées dans les cancers colorectaux, testiculaires et pancréatiques[314], [417], [418]. Néanmoins, le DCC a été examiné pour les changements génétiques trouvés avec la plupart des autres gènes suppresseurs de tumeurs, mais il s'est démontré avoir une fréquence relativement faible de mutation somatique.

Le rôle du DCC comme suppresseur de tumeur, proposé au début des années 90, a été mis en doute par des études contradictoires qui ont étudié l'effet direct de la délétion de DCC sur la formation spontanée de tumeurs colorectales. De manière étonnante, la délétion des deux allèles de DCC chez la souris s'est avérée létale, ce qui a limité le nombre des études réalisées dans ce contexte. Cependant en 1997, Fazeli et ces collègues ont pu générer des souris présentant une invalidation homozygote de DCC en croisant des souris présentant une délétion du gène *Apc* (*Apc* +/-*min*) situé dans la même région que DCC avec des souris *DCC*+/- hétérozygotes. Les souris *DCC* -/- générées ne présentaient pas une augmentation du nombre de tumeurs spontanées apparues par rapport aux souris contrôles. De plus cette perte homozygote de DCC n'avait aucun effet sur l'agressivité des tumeurs[347]. Cependant, les étapes de la cancérogenèse colorectale chez la souris et l'homme sont différentes. Chez l'homme la formation des tumeurs colorectales sont associées à plusieurs mutations touchant une variété de gènes comme *Kras* ou *p53*[419] alors que chez la souris *Apc* +/-*min* l'invalidation de ces gènes ne cause pas une aggravation du phénotype tumoral intestinal.

Alors que les maladies causées par la perte du chromosome 18q ont été corrélées directement à la perte du DCC, des études ont montré l'implication d'autres gènes perdus par cette délétion dans les cancers. Parmi ces gènes se trouvent deux gènes suppresseurs de tumeurs ; *SMAD2* et *SMAD4*[411]. Ces deux gènes sont impliqués dans des voies de signalisation du TGF- β . Pendant que la perte de *SMAD2* s'avère rare dans les cancers, *SMAD4* reste un meilleur candidat puisque sa perte par mutation germinale a déjà montré une implication dans le

syndrome familial de polypose juvénile[420], [421]. Des mutations somatiques de SMAD4 ont été également décrites dans une fraction des cancers colorectaux[422], [423].

Toutes ces études qui montraient que DCC ne contrôle pas le cycle cellulaire, qu'il a un faible taux de mutation somatique et qu'il n'augmente pas la prédisposition au cancer chez les hétérozygotes, étaient des preuves assez décourageantes pour le statut putatif de suppresseur de tumeur du DCC. Cela a amené l'attention à se concentrer sur son rôle dans le guidage des axones, jusqu'à ce qu'une étude réalisée par Patrick Mehlen en 1998, a démontré l'implication de DCC dans la régulation de la mort cellulaire[378]. Pendant que les délétions chromosomiques 18q n'ont jamais été identifiées comme étant uniquement liées à un autre gène, le DCC a été rapidement ré-accepté comme candidat. Des études réalisées *in vitro* sur les mécanismes de signalisation du DCC ont corroboré l'hypothèse que DCC est un suppresseur de tumeur et ont commencé à intégrer la double fonctionnalité du DCC en tant que molécule de guidage des axones et suppresseur de tumeur en un seul temps selon sa présence ou son absence dans les différents tissus[378], [424].

Parallèlement, plusieurs travaux expérimentaux ont montré que la restauration de l'expression du DCC dans des lignées tumorales humaines réduit la prolifération cellulaire *in vitro* et la croissance des tumeurs *in vivo* chez la souris[425], [426] et induit l'apoptose de lignées cellulaires tumorales déficientes en DCC endogène en absence de nétrine-1[427]. Une étude réalisée par Castets et al. en 2011 a montré qu'une mutation dans le domaine intracellulaire de DCC précisément sur le site de clivage (D1290N) est suffisante d'inhiber l'apoptose induite par DCC dans un modèle de souris prédisposé par une mutation du gène APC (1638N).[428]

c- Rôle de UNC5 dans la carcinogenèse et la progression tumorale

L'expression des récepteurs UNC5 est négativement régulée dans divers cancers, dont le cancer colorectal[429]. Des études ont montré que la méthylation du promoteur des gènes UNC5A, UNC5B et UNC5C est la raison principale de l'arrêt de leur expression[429], [430]. Le

récepteur UNC5D a été identifié plus tard et il est cartographié dans une région chromosomique fréquemment absente dans de nombreux cancers durant une étude portant sur l'ensemble du génome, visant à identifier les loci génétiques prédisposant à la carcinogenèse du côlon chez la souris [431], [432].

La démonstration formelle que les récepteurs UNC5 se comportent comme des suppresseurs de tumeur authentiques a été fournie par l'analyse de la souris qui souffre d'une malformation du cervelet rostral (MCR) chez qui il a été démontré une perte de la fonction de UNC5H3 suite à une mutation. Ces souris atteignent l'âge adulte et ne présentent pas de développement tumoral intestinal évident par rapport aux souris témoins, ce qui suggère donc que l'inactivation du gène UNC5H3 chez la souris ne constitue pas un événement génétique suffisant pour déclencher l'initiation de la tumeur[325]. Néanmoins, lorsqu'elles sont croisées avec des souris mutantes APC, les souris mutantes $UNC5H3^{mcr/mcr}$ ont présenté une fréquence élevée de lésions néoplasiques similaires à celles des souris $APC^{+/1638N}$, tout en montrant un passage spectaculaire d'adénomes de bas grade vers des tumeurs de stade plus avancé. Ainsi, les études ont montré que l'inactivation de UNC5H3 est associée à un stade tumoral accru en présence d'une mutation de l'APC, tout en démontrant qu'elle confère un avantage sélectif au cancer colorectal[429].

Il est intéressant de noter que des mutations de la lignée germinale du gène UNC5C pourraient augmenter la prédisposition au cancer colorectal. L'ADN génomique d'échantillons de sang humain d'individus non apparentés ayant des antécédents familiaux de cancer colorectal a été analysé pour des mutations spécifiques du gène UNC5C. L'analyse a conduit à la détection de plusieurs mutations dans le gène UNC5C, dont l'une a entraîné une perte significative de l'activité proapoptotique du récepteur UNC5C et un transfert héréditaire de la maladie[433]. En revanche, une autre étude a démontré une augmentation non-significative du risque de cancer colorectal familial et sporadique, ce qui suggère plutôt que la présence de variantes UNC5C

dans les familles n'est pas suffisante pour conférer un risque élevé de cancer colorectal[434]. Des investigations supplémentaires seront nécessaires pour déterminer si la recherche de UNC5C pourrait être un marqueur de diagnostic pour les cancers colorectaux familiaux ou sporadiques[433], [434].

Finalement, il est déjà démontré que la surexpression de chacun des récepteurs UNC5A, B et C dans différentes lignées tumorales suffit à bloquer leur capacité de croissance indépendante de l'ancrage et leur pouvoir d'invasion indiquant un rôle de suppresseur de tumeur[435].

4.1.6. Ciblage thérapeutique de la nétrine-1

En raison de son rôle dans la survie des cellules tumorales, la progression tumorale et les métastases, il a été émis l'hypothèse que l'inhibition de la liaison de la nétrine-1 à ses récepteurs de dépendance réactiverait la signalisation de l'apoptose et éliminerait donc les cellules cancéreuses. Par conséquent, l'interférence avec la nétrine-1 a montré une efficacité thérapeutique dans différents types de tumeurs[333], [399]–[402], [406], [436], [437]. Il a été démontré que la combinaison d'une thérapie d'interférence à la nétrine-1 avec une chimiothérapie augmente encore la mort des cellules cancéreuses, suggérant ainsi une combinaison de chimiothérapie conventionnelle avec une thérapie moléculaire ciblée par la nétrine-1 pour le traitement du cancer[406]. Étant donné que les récepteurs de dépendance sont fréquemment sous-régulés épigénétiquement, par méthylation du promoteur, la combinaison d'une thérapie d'interférence à la nétrine-1 avec des épigénétiques présente en outre une approche thérapeutique prometteuse[333], [437]. Une étude clinique de phase 1 évaluant la sécurité, la pharmacocinétique et l'activité clinique d'un anticorps monoclonal ciblant la nétrine-1 (NP137) chez des patients atteints de tumeurs solides avancées a eu lieu à Lyon, en France[438]. Le grand défi dans l'utilisation d'une thérapie ciblée est l'identification des patients qui présentent l'anomalie moléculaire correspondante et qui sont susceptibles de bénéficier de la thérapie. Dans le cas du ciblage de la nétrine-1, une biopsie tissulaire est réalisée pour évaluer

l'expression de la nétrine-1 par hybridation in situ. Elles fournissent des informations limitées en fonction du site de collecte et nécessitent un traitement et une analyse ex vivo coûteux. Pour cela, d'autres techniques comme l'imagerie sont nécessaires pour mieux caractériser les tumeurs.

4.2. Ectodysplasine A1 et son récepteur EDAR

L'ectodysplasine (Eda) fait partie de la superfamille du facteur de nécrose tumorale (TNF) et a un rôle bien reconnu dans le développement des organes ectodermiques. La voie Eda se compose de l'Eda, de son récepteur EDAR et d'une molécule adaptatrice cytosolique EDARADD (domaine de mort associé à EDAR)[439]. Chez l'homme, les mutations germinales dans l'un des trois gènes provoquent un syndrome rare appelé dysplasie ectodermique hypohidrotique (HED). La HED est la maladie génétique la plus courante affectant le développement des ectodermes et se caractérise par un développement défectueux de plusieurs appendices ectodermiques conduisant à des cheveux épars, des dents déformées, et une transpiration absente ou sévèrement réduite. De plus, les ongles et les glandes lacrymales, salivaires, mammaires, de Meibomius et les glandes muqueuses des voies respiratoires sont souvent affectés. Au cours de leurs premières années de vie, les enfants atteints de HED ont une morbidité et une mortalité augmentées en raison de l'hyperthermie résultant de l'hypohidrose et d'un risque plus élevé d'infections respiratoires en raison d'une carence en glandes nasales, trachéales et bronchiques[440], [441].

4.2.1. Structure

a- Ectodysplasine

Le gène EDA humain a d'abord été identifié par clonage positionnel chez des patients développant une XLHED (appelée X-linked HED ou également dysplasie ectodermique hypohidrotique liée au chromosome X) et se situe sur le bras long du chromosome X plus

spécifiquement sur Xq13.1[442]. Il est formé de 13 exons. Les transcrits EDA subissent des épissages complexes donnant lieu à de nombreuses isoformes EDA, dont seules les deux plus longues, EDA1 et EDA2, contiennent le THD, interagissent avec les récepteurs et sont connues pour être biologiquement actives[443], [444]. Les deux isoformes de l'ectodysplasine sont des protéines transmembranaires de type II. L'EDA2 qui contient 389 acides aminés est plus courte que l'EDA1 qui se compose de 391 acides aminés. Ces deux résidus d'acides aminés de différences au niveau du THD (Glu308 et Val309) sont la conséquence de l'utilisation différentielle d'un site d'épissage à la fin de l'exon 7[445]. L'ectodysplasine EDA1 est une protéine membranaire longue avec un court domaine intracellulaire, un domaine transmembranaire, une région pédonculaire de fonction non caractérisée, une séquence consensus de clivage de la furine responsable du traitement protéolytique de l'EDA pour produire une forme sécrétée, une courte séquence chargée positivement requise pour les interactions avec des protéoglycanes de type sulfate d'héparane, un domaine de type collagène nécessaire pour la multimérisation de plusieurs protéines et un domaine d'homologie TNF C-terminal (THD) long de 150 acides aminés responsable de la liaison au récepteur. Ce dernier domaine forme des homotrimères qui peuvent se lier à trois récepteurs individuels à chaque interface monomère-monomère[446].

Les mutations EDA identifiées chez les patients XLHED touchent plusieurs régions distinctes de la protéine qui sont donc considérées comme ayant une importance fonctionnelle[447]. La première se situe au début de la région extracellulaire juste après le domaine transmembranaire, mais l'importance de cette région sur l'expression et la fonction de EDA est inconnue. Une étude a démontré qu'un certain polymorphisme limité à une transition Leu79Pro au début de la région de la tige chez les poissons qui ont évolué en eau douce cause une réduction spectaculaire de leur armure osseuse par rapport aux poissons océaniques de la même espèce[298]. La deuxième région affectée par des mutations est le site de clivage consensus de la furine,

indiquant que l'EDA1 doit être libéré sous une forme soluble pour afficher l'activité. Troisièmement, les mutations qui touchent la région du THD affectent soit la formation des trimères soit la liaison de l'EDA à son récepteur[447], [448]. La quatrième région est le domaine du collagène qui sert à maintenir deux ou plusieurs trimères EDA1 à proximité immédiate au sein de la même molécule et donc à potentialiser sa capacité à stimuler la signalisation EDAR[447], [449]. Enfin, aucune mutation dans la région de liaison aux protéoglycanes n'a été signalée chez les patients XLHED, soit parce que cette interaction n'est pas essentielle pour la fonction de l'EDA, soit parce que l'interruption de l'interaction ne peut être obtenue ni avec une mutation ponctuelle ni avec la délétion de l'exon 3, qui induirait un décalage de trame.

b- Récepteurs à Ectodysplasin EDAR and XEDAR

EDAR (ectodysplasin receptor) est un récepteur de type I appartenant à la famille des récepteurs TNF (tumor necrosis factor) de 448 acides aminés et codé par un gène localisé sur le chromosome 2q13 et formé de 12 exons. Il possède un peptide signal, trois domaines riches en cystéines (CRD), un domaine transmembranaire et une région intracellulaire comprenant un « domaine de mort ». La partie extracellulaire de l'extrémité N-terminale est de 159 acides aminés et ressemble à un récepteur TNF appelé Troy, alors que la partie C-terminale intracellulaire est constituée de 237 acides aminés et contient un domaine de mort semblable à celui trouvé dans le récepteur à neurotrophine (p75).

Les études ont montré que la plupart des mutations chez les patients atteints de HED autosomique se passent dans le CRD2, qui est impliqué dans la liaison du ligand, ou dans le domaine de mort, qui est impliqué dans la transmission du signal. Dans les récepteurs de mort Fas et TRAILR2, le domaine de mort recrute la protéine associée à Fas avec un domaine de mort (FADD), qui recrute et active lui-même les cystéines protéases de la famille des caspases pour exécuter la mort cellulaire apoptotique. EDAR n'interagit pas avec FADD, mais recrute à la place EDARADD, une autre protéine adaptatrice de 208 acides aminés constituée d'une

séquence consensus de liaison à Traf NH₂-terminale et d'un domaine de mort COOH-terminal le plus similaire au domaine de mort de MyD88[450]–[452].

En 2000, Yan et ses collègues ont découverts un autre récepteur à ectodysplasine localisé sur le chromosome Xq12, induit par p53 et constitué de 9 exons. Ce récepteur a été nommé XEDAR (ou aussi EDA2R) puisqu'il a été trouvé similaire aux gènes EDAR et Troy humains durant une recherche basée sur la similitude au niveau des séquences nucléotidiques dans la base de données[445]. XEDAR est aussi un membre de la famille TNFR. Deux isoformes alternativement épissées de XEDAR ont été rapportées qui diffèrent dans leur région proximale membranaire du domaine cytoplasmique[445], [453]. XEDAR est une protéine transmembranaire de type III de 297/318 acides aminés (dépourvue de peptide signal NH₂-terminal) qui contient une région extracellulaire avec trois domaines riches en cystéine, une seule région transmembranaire et une région intracellulaire sans homologie significative avec d'autres TNFR. Le domaine de liaison au ligand de XEDAR est identique à environ 50% avec Troy mais seulement environ 32% avec EDAR. Ainsi, il était plutôt inattendu que parmi les 17 ligands TNF testés, XEDAR se soit lié spécifiquement à Eda-A2[445], [447]. Ponctuellement, aucune réactivité croisée entre EDA1 et XEDAR n'est trouvée et de même entre EDA2 et EDAR[445], [454]–[456]. Cette spécificité de liaison de EDA1 à EDAR et EDA2 à XEDAR est conservée chez les mammifères. Jusqu'à présent, XEDAR n'a été associé à aucun syndrome humain.

4.2.2. Expression et rôle durant le développement et dans les tissus

L'EDA1 qui appartient à la famille des facteurs de nécrose tumorale, agit comme un homotrimère et peut être impliquée dans la signalisation cellule-cellule lors du développement des organes ectodermiques. Ces voies de signalisation influencent la croissance de tous les tissus qui se différencient de l'ectoderme ; cheveux, peau, ongles, dents, etc...

Les appendices dérivés de la peau, tels que les cheveux, les dents et les glandes mammaires, ont une fonction et une structure différentes mais partagent des aspects de développement communs. La première étape de développement est la formation d'un épaissement de la couche épithéliale, les placodes, accompagné de la condensation du mésenchyme sous-jacent. Les placodes sont des centres de signalisation embryonnaires qui expriment des molécules de signalisation telles que les protéines de la famille Wnt, FGF, TGF β , Hedgehog et TNF[457], [458]. À l'étape suivante du développement, les placodes s'invaginent dans le mésenchyme pour former des bourgeons qui se développent de manière spécifique à chaque organe. Les interactions entre les cellules et les tissus épidermiques et dermiques sous-jacents sont des thèmes courants et récurrents du développement d'organes par scission.

La placode est formée par un regroupement de kératinocytes épidermiques en réponse à un signal provenant du derme qui pourrait être Wnt ou un inducteur de Wnt. Les placodes expriment des molécules inductrices pour renforcer la signalisation et des molécules inhibitrices pour empêcher la différenciation à la périphérie des placodes jusqu'à ce qu'un réseau régulier de follicules pileux soit établi[459], [460]. Chaque placode induit des cellules mésenchymateuses sous-jacentes à s'agréger et à former le condensat dermique[460]. Ceci est suivi par la prolifération et la croissance vers le bas des cellules épithéliales dans le derme jusqu'à ce qu'elles entourent le condensat dermique qui devient la papille dermique. La communication latérale entre la papille dermique et l'épithélium folliculaire induit la prolifération des cellules de la matrice épithéliale qui donnent naissance à différentes lignées de follicule pileux formant d'abord les différents types cellulaires de la gaine radiculaire interne (couche de Henley, couche de Huxley et cuticule) puis celles des matures tige pileuse (cuticule, moelle et cortex)[461]. La gaine radiculaire interne est entourée par la couche de cellules compagnes et par la gaine radiculaire externe qui est contiguë et similaire à la couche basale épidermique.

Des modèles de souris étaient mis en place pour étudier les mutations qui causent la perte de la fonction de Eda. Ces souris présentent le phénotype Tabby qui est l'équivalent murin de ectodysplasie humaine (XLHED). Les souris tabby ont un seul type de poil anormal, pas de poils sur la queue, n'ont pas de poils fins derrière les oreilles mais ont des poils sur la peau de l'oreille. Ils manquent de glandes sudoripares, de glandes de Meibomius, de glandes trachéales et présentent des anomalies plus ou moins marquées dans les glandes sébacées, les glandes mammaires et les glandes salivaires

Chez les adultes, l'implication de l'ectodysplasine dans la régulation des différentes parties de l'ectoderme est peu connue et l'expression de l'Eda n'est pas détaillée. L'analyse Northern blot a révélé l'expression de l'Eda humaine dans le cœur, les reins et le pancréas, ainsi qu'une expression plus faible dans le cerveau, le placenta, les poumons, le foie et les muscles squelettiques[442]. Cela correspond assez bien à l'analyse effectuée chez la souris[462]. En utilisant une méthode RT-PCR plus sensible, l'expression de l'Eda a été observée dans pratiquement tous les tissus humains testés[444]. L'analyse in situ montre que chez l'adulte, l'expression est principalement épithéliale. En plus des organes affectés, une expression a été détectée dans les reins, les ganglions sympathiques, l'hypothalamus, dans l'épithélium des glandes mammaires et dans l'épithélium canalaire de la prostate[463], [464]. L'importance de l'expression adulte n'est actuellement pas connue. L'expression de l'Eda n'a été étudiée que dans quelques situations pathologiques. Son expression semble être moins abondante à la fois bénigne et maligne

4.2.3. Différentes voies de signalisation induites et influencées par EDAR

a- Voie canonique de NF- κ B

La signalisation par les TNFR conduit à des différentes réponses selon le type de cellule et les autres signaux que la cellule reçoit. Le résultat le plus typique étant l'activation du facteur de transcription NF- κ B (Figure 8). La transfection des cellules rénales de singe avec EDAR

entraîne une activation dose-dépendante de NF- κ B qui, peut être améliorée par la co-expression du ligand[445], [456], [465]. La réponse NF- κ B peut être efficacement bloquée par des mutants dominants négatifs de NIK, IKK1, IKK2 et I κ B α [456]. Pratiquement aucune réponse NF- κ B n'est détectée dans les cellules transfectées avec des formes mutantes d'EDAR y compris celles dépourvues du domaine de mort[456], [465], suggérant que l'engagement de la voie NF- κ B est essentiel pour la fonction d'EDAR. Cependant, une activité résiduelle importante est détectée dans les cellules transfectées avec un mutant E379K trouvé chez des souris sans duvet avec le phénotype récessif indiquant que deux de ces allèles sont nécessaires pour altérer de manière significative la signalisation NF- κ B[456], [465].

En présence de EDA1, EDARADD de type sauvage se lie au DD d'EDAR mais pas à un EDAR muté sans DD. Par rapport à l'interaction d'EDARADD avec EDAR, une mutation ponctuelle Glu142Lys dans la DD d'EDARADD a été trouvée dans une famille avec HED autosomique et la protéine mutante EDARADD correspondante a été considérablement altérée dans sa capacité à se lier à EDAR et à activer NF- κ B[451]. EDARADD interagit avec au moins Traf1, Traf2, Traf3, et peut-être avec Traf5 et Traf6, mais pas avec Traf4[451], [452]. Étant donné qu'aucun modèle d'expression de l'une des molécules Traf au cours du développement des organes ectodermiques n'a été publié, à l'exception de l'expression de Traf6 dans les follicules pileux en développement[466], il est actuellement difficile de savoir si tous ou seulement certains de ces adaptateurs sont utilisés dans cette signalisation *in vivo*.

Il existe de bonnes preuves *in vivo* pour soutenir l'importance de l'activation de NF- κ B dans la transduction de la signalisation EDAR. Des mutations réduisant l'activité d'IKK / NEMO, indispensables à la signalisation canonique NF- κ B[467], provoquent des défauts ectodermiques similaires à ceux observés chez les patients HED[468], [469]. De plus, l'analyse de la voie de signalisation a confirmé que l'activation de NF- κ B par EDAR est dépendante de l'IKK[470] et des études ont montrés que les souris transgéniques exprimant un I κ B constitutivement actif

ont des défauts au niveau des dents ainsi que des follicules pileux et des glandes exocrines identiques aux anomalies trouvées chez les souris Tabby[471]. Ces données *in vivo* suggèrent que la signalisation EDAR est médiée pour la plupart, sinon totalement, par NF- κ B. Ponctuellement, la carence en Traf6 entraîne également un développement aberrant de plusieurs appendices épidermiques et un phénotype ectodermique ressemblant à celui des souris Tabby[466]. Comme Traf6 se lie fortement à la queue cytoplasmique de XEDAR et faiblement à Troy et EDARADD[452], [466], il n'est pas encore clair quelle voie de signalisation est abrogée chez ces souris.

Les TNFR avec des domaines de mort sont souvent capables d'induire la mort cellulaire en recrutant directement ou indirectement d'autres molécules adaptatrices favorisant la mort telles que Fadd. EDAR ne lie pas Fadd ni Tradd mais exclusivement, ce récepteur lie EDARADD seulement[452], [456].

Des résultats contradictoires ont été obtenus concernant la capacité d'EDAR à induire la mort cellulaire dans les cellules transfectées[456], [465]. Les études réalisées sur les patients souffrant d'une HED et les mutants de souris correspondants ont montré que ces individus manquent complètement les organes affectés ou que leur développement est hypoplasique, il est plus plausible que la fonction physiologique d'EDAR soit plutôt d'améliorer la survie cellulaire que de favoriser la mort cellulaire. De plus, au cours du développement précoce du follicule pileux, seules quelques cellules apoptotiques sont détectées[471]–[473] et elles ne semblent pas se localiser avec les sites connus d'expression d'EDAR. Au lieu de cela, une apoptose accrue est détectée dans les follicules pileux en développement des souris transgéniques I κ B α mentionnées ci-dessus qui imitent le phénotype Tabby[471]. Ces données montrent qu'EDAR est un gène potentiel qui améliore la survie de la cellule.

Des résultats contradictoires ont été obtenus concernant l'activation de la voie JNK par EDAR[456], [465]. Cela peut être dû à des différences dans la configuration expérimentale ou

les lignées cellulaires utilisées. Dans tous les cas, la capacité inductrice de JNK d'EDAR était relativement faible par rapport à certains autres TNFR[456]. De façon intéressante, de nombreuses molécules de la voie JNK, y compris c-jun et c-fos, sont sous-régulées dans la peau de souris Tabby adultes[474]. Ainsi, jusqu'à présent, la voie JNK n'a pas directement montré de rôle dans le développement de l'appendice ectodermique.

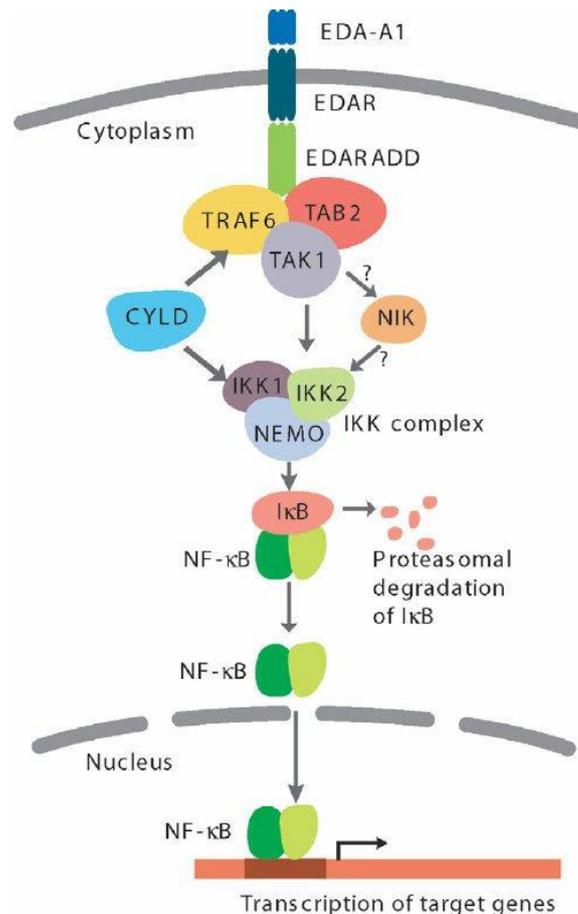


Figure 8 : modèle de signalisation du récepteur EDAR. (Morlon et al. 2006)

La liaison du ligand Ectodysplasine (EDA-A1) au récepteur EDAR de type TNF, conduit à la formation d'un complexe contenant Edaradd, TRAF6, TAB2 et TAK1. TAK1 active le complexe IKK soit directement, soit via l'activation de NIK, qui à son tour phosphoryle IKK. L'activation du complexe IKK conduit à l'ubiquitination et à la dégradation protéasomale des protéines inhibitrices IκB et à la libération du facteur de transcription NF-κB. NF-κB se déplace dans le noyau où il active la transcription des gènes cibles.

b- Influence sur la voie Wnt

Les voies Wnt/ β -caténine et Eda/EDAR/ NF- κ B présentent des contrôles réciproques, comme en témoigne leur coexpression spatio-temporelle dans le développement des dents. Il a été démontré que Wnt/ β -caténine active la voie Eda/EDAR/NF- κ B en induisant l'expression de l'Eda, qui à son tour est nécessaire pour maintenir les activités soutenues de Wnt/ β -caténine. Les preuves cliniques ont montré que les mutations digéniques dans l'EDA et le WNT10A modifiaient la gravité phénotypique chez les individus atteints d'agénésie dentaire[475].

Chez les souris déficientes en EDAR ou chez les souris déficientes en signalisation Wnt (suppression de la β -caténine), les poils primaires ne se forment pas[450], [476]. Les premières études sur des souris knock-out où la β -caténine a été supprimée dans les cellules épithéliales, ont conclu que la signalisation Wnt pouvait être en aval d'EDAR, car EDAR était le seul marqueur de placode encore exprimé dans la peau des souris déficientes en β -caténine[476]. Cette conclusion selon laquelle EDAR n'était pas un gène sensible à Wnt a ensuite été révisée lorsque la β -caténine a été supprimée dans des stades plus précoces. En effet, l'expression d'EDAR et l'activation de NF- κ B dans la peau étaient absolument dépendantes de l'activité de la β -caténine dans l'épithélium, et EDAR a été caractérisé comme un gène cible direct de Wnt[477]. De même, l'expression uniforme initiale de l'Eda est également indépendante[477]–[479]. Bien que la signalisation Wnt agisse en amont d'EDAR dans les placodes capillaires primaires, le maintien de l'activité de la β -caténine dans les placodes primaires à un stade ultérieur nécessite une activité EDAR[477]. La signalisation EDAR induit l'expression de Wnt10b, un gène cible direct de NF- κ B, qui est un bon candidat pour la médiation du deuxième cycle de signalisation de la β -caténine dans les placodes[477]. Intéressamment, forcer la signalisation d'EDAR dans les placodes capillaires primaires en co-inhibant Wnt n'a pas réussi à sauver l'expression de gènes cibles EDAR tels que Shh, indiquant que l'expression de gènes

Wnt-dépendants autres que Eda et EDAR est nécessaire pour une signalisation EDAR réussie[477].

4.2.4. Induction de l'apoptose par les TNF : EDAR récepteur à dépendance.

La croissance cellulaire normale nécessite un équilibre précisément contrôlé entre la mort cellulaire et la survie. Cet équilibre qui maintient l'homéostasie de la cellule, est assuré par des récepteurs qui contrôlent la survie selon le microenvironnement dans lequel la cellule se trouve.

La cellule possède deux façons différentes pour mourir. Elle passera soit par une nécrose, soit par une apoptose ; alors que la mort cellulaire se produit par nécrose (mort cellulaire traumatique en réponse à une blessure physique) l'apoptose ou une mort cellulaire programmée, est un processus hautement réglementé et contrôlé génétiquement codé, durant lequel la cellule participe activement à sa propre destruction. Les facteurs de nécrose tumorale sont considérés comme des stimuli fournissant des signaux suicidaires à travers différentes protéines contenant un domaine de mort, conduisant ainsi à l'apoptose[480]. Les TNFR sont principalement impliqués dans l'apoptose et l'inflammation, mais ils peuvent également participer à d'autres voies de transduction du signal[481]. De tous les membres de la superfamille des TNFR, les deux récepteurs ; TNFR1 et TNFR2, sont les mieux caractérisés. Alors que TNFR1 est exprimé par presque tous les types de cellules de mammifères, l'expression de TNFR2 est essentiellement limitée aux cellules immunitaires et aux cellules endothéliales. Le TNFR1 contient un domaine intracellulaire, appelé « domaine de mort » (DD). Les TNFR présentant un tel domaine sont appelés « récepteurs de mort ».

Les récepteurs de mort activés recrutent des protéines adaptatrices contenant du DD conduisant à l'assemblage d'un grand complexe protéique qui sert de plate-forme de liaison pour les molécules de signalisation. De même, EDAR présente un DD[450], ce qui le rend comparable à TNFR1.

La plupart des TNFR nécessitent des protéines adaptatrices spécifiques telles que TRADD (Tumor necrosis factor receptor type 1-associated death domain protein)[482] et FADD (Fas-Associated protein with Death Domain)[483].

Au contact de son ligand, le TNFR1 subit une multimérisation pour former des trimères, afin de s'insérer dans les sillons formés entre les monomères du TNF. Cette liaison conduit à un changement conformationnel du récepteur, provoquant la dissociation de la protéine SODD (silencer of death domain) inhibitrice de la mort du domaine de mort intracellulaire[484]. Cette dissociation permet à TRADD de se lier au DD, servant de plate-forme pour la liaison ultérieure des protéines. Comme tous les membres de la superfamille des TNFR contenant un domaine de mort, le TNFR1 est impliqué dans la signalisation de la mort[485]. Une fois que TRADD est lié, il se lie ensuite à FADD, qui recrute ensuite la caspase-8[486] via son domaine N-terminal DED (FADD-like death effector domain) ainsi que la pro-caspase 10. À une concentration élevée, caspase-8 induit son activation auto-protéolytique et le clivage subséquent des caspases effectrices, telles que la caspase-3 et la caspase-7, dirigeant la cellule vers l'apoptose.

Alors qu'EDAR est généralement considéré comme un récepteur de signalisation NF- κ B, la présence du DD dans sa structure a conduit à plusieurs études visant à étudier la capacité d'EDAR à déclencher la mort cellulaire[487]. Les résultats ont montré que l'expression d'EDAR dans les cellules semble suffisante pour augmenter de manière significative l'activité de la caspase-3 et la fragmentation de l'ADN, qui sont des changements typiques observés lors de l'apoptose[481]. De plus, non seulement la présence de DD d'EDAR permet l'induction de la mort cellulaire par apoptose, mais aussi sa suppression l'empêche. De plus, des expériences ont été faites pour bloquer l'activité du FADD afin d'évaluer s'il est impliqué ou non dans l'induction de la mort cellulaire par EDAR. Ce blocage n'a montré aucun effet observé sur la capacité d'EDAR à induire l'apoptose. En revanche, lors de la désactivation d'EDARADD, la voie de signalisation de l'apoptose semblait être modifiée[481].

Dans une étude réalisée récemment, Jonathan Vial et al. ont pu démontré dans des modèles cellulaires humaines comme HEK293 que la surexpression de EDAR peut induire l'apoptose à travers EDARADD et clivage de caspase-8[481]. En outre, des expériences supplémentaires dans la même étude ont été menées pour comparer la relation EDAR/caspase-8 à la relation des récepteurs de mort avec caspase-8 lors de l'induction de l'apoptose. Ces expériences ont prouvé que la mort cellulaire induite par EDAR est désactivée lorsque la caspase-8 est bloquée, ce qui confirme l'implication de la caspase-8 dans l'induction de la mort cellulaire par EDAR[481]. Le schéma proposé le plus logique est qu'EDAR interagit avec EDARADD mais n'induit l'apoptose par caspase-8 qu'en absence du ligand EDA1. Ce schéma partage de nombreuses similitudes avec les récepteurs de mort en ce qui concerne la transduction de l'apoptose, mais tout en gardant des particularités à EDAR : recruter son propre adaptateur EDARADD au lieu de FADD et induire l'apoptose seulement en absence de son ligand, ce qui le classe parmi les récepteurs à dépendance.(Figure 9)

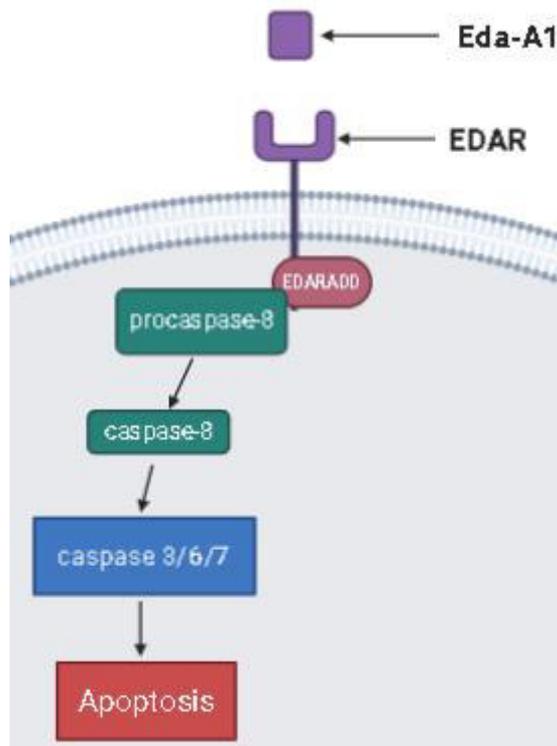


Figure 9 : modèle d'induction de l'apoptose par EDAR. (Adapté de Vial et al. 2019)

En absence de l'EdaA1 il est suggéré qu'EDAR interagit avec la protéine adaptatrice EDARADD qui recrute la procaspase-8 qui par suite est clivée pour induire l'apoptose par une cascade de caspase.

4.2.5. c-FLIP : régulateur anti-apoptotique

a- Structure

La protéine anti-apoptotique c-FLIP est une protéine contenant un domaine effecteur de mort (DED) qui est recrutée au DISC et régule l'activation des caspases-8 et -10 dans les voies de signalisation des récepteurs de mort. Elle possède 13 variantes d'ARNm distinctes, mais seulement trois sont exprimées sous forme de protéines: une forme courte « c-FLIP_S » de 26 kDa, une forme nommée c-FLIP_R de 24 kDa et une forme longue « c-FLIP_L » de 55 kDa[488]–[490]. Les structures de c-FLIP_S et des protéines virales v-FLIP sont similaires, sauf que les deux DED de c-FLIP_S sont suivis de 20 acides aminés qui semblent cruciaux pour son ubiquitinylation et le ciblage de la dégradation protéasomique[488]–[491]. c-FLIP_R contient

également deux DED, mais n'a pas les acides aminés C-terminaux supplémentaires qui sont présents dans c-FLIP_S. L'extrémité C-terminale de c-FLIP_L est plus longue que celle de c-FLIP_S et ressemble étroitement à la structure des caspases-8 et caspases-10[488]–[491], mais cette région de c-FLIP_L ne contient pas de domaine caspase fonctionnel . Ce manque d'activité caspase est le résultat de plusieurs substitutions d'acides aminés, en particulier le résidu de cystéine crucial dans le domaine catalytique qui est nécessaire pour l'activité catalytique des caspases[488], [491]. De plus, c-FLIP_L a un site de clivage caspase-8 à la position Asp-376; Le clivage de c-FLIP_L à ce site produit le variant de fragment protéolytique p43c-FLIP[488]–[491]. La région C-terminale de c-FLIP_S et c-FLIP_R joue un rôle crucial dans l'ubiquitinylation et la dégradation ainsi que la fonction anti-apoptotique de ces isoformes[488]–[491]. Chez l'homme, la décision de produire un c-FLIP_S ou c-FLIP_R est définie par un polymorphisme nucléotidique unique dans un site d'épissage 3' du gène c-FLIP. Un site d'épissage intact dirige la production de c-FLIP_S, mais la variante morte d'épissage provoque la production de c-FLIP_R[492]. En raison des différences de taux de traduction des protéines, des niveaux plus élevés de protéine c-FLIP_S sont produits par rapport à c-FLIP_R[492]. Les trois variantes c-FLIP peuvent interagir avec la protéine adaptatrice FADD.

b- Surexpression dans les cancers humains

Une expression élevée des isoformes c-FLIP a été trouvée dans des lignées cellulaires de divers types de cancers, y compris le cancer colorectal[488], [490], [491]. Des niveaux élevés de c-FLIP dans les tissus tumoraux des patients atteints d'un cancer colorectal[493], [494], d'un cancer de la vessie[495], d'un cancer du col de l'utérus[496], d'un lymphome de Burkitt[497], d'un lymphome non hodgkinien[498], de la tête et du cou le carcinome épidermoïde (HNSCC)[499] et les cancers hépatocellulaires[500] ont été corrélés à de mauvais résultats cliniques et pourraient être un facteur pronostique fiable dans ces types de cancer. La régulation positive de c-FLIP est également observée dans le cancer gastrique[501]–[503] et joue un rôle

important dans les métastases ganglionnaires, ce qui contribue finalement à la progression tumorale[502]. Les isoformes de c-FLIP sont également exprimées dans les néoplasmes intraépithéliaux pancréatiques ainsi que dans les adénocarcinomes canaux pancréatiques, alors que les canaux pancréatiques normaux étaient systématiquement négatifs pour l'expression de c-FLIP[504]. McCourt et coll. [505] ont rapporté que l'expression de c-FLIP était augmentée dans les néoplasies intraépithéliales prostatiques de haut grade et les tissus cancéreux de la prostate par rapport à l'épithélium prostatique normal. De manière significative, ces auteurs ont découvert qu'une expression maximale de c-FLIP était détectée dans le cancer de la prostate résistant à la castration.

c- Rôle de c-FLIP dans la prévention de l'apoptose et le maintien de l'homéostasie

c-FLIP joue un rôle dans les signalisations qui impliquent TRAIL, Fas, TNF- α ainsi que dans la résistance aux médicaments chimiothérapeutiques dans un large éventail de tumeurs malignes humaines[488]–[491]. De plus, des études utilisant des souris déficientes en c-FLIP soutiennent une double fonction pour c-FLIP_L en confirmant un rôle pour c-FLIP dans la signalisation de Fas L, l'apoptose induite par TNF- α et révélant que c-FLIP a une fonction similaire à la caspase-8 dans le développement cardiaque[506]. Néanmoins, la majorité des études réalisées récemment sur divers types de cellules cancéreuses humaines indiquent que l'action de c-FLIP est généralement anti-apoptotique dans les cellules cancéreuses. De plus, l'interférence avec l'expression de c-FLIP sensibilise les cellules tumorales aux ligands de la mort et à la chimiothérapie dans les modèles expérimentaux[490], [491], [507]–[509]. En plus de sa fonction de modulateur de l'apoptose, c-FLIP augmente la prolifération cellulaire et accélère la tumorigenèse[489]–[492]. Les différences structurales entre les variantes c-FLIP humaines leur confèrent des rôles régulateurs distincts. c-FLIP_S inhibe la formation de DISC induite par TRAIL et l'apoptose[510], [511], tandis que c-FLIP_L est responsable de la double fonction décrite ci-dessus, par laquelle, quand il est surexprimé, il inhibe l'activation de la

caspase-8 induite par Fas, et quand il est sous-exprimé, il améliore l'activation de la caspase-8[490], [491]. c-FLIP_S supprime également l'apoptose en inhibant l'activation de la caspase-8[512], [513]. Il a été démontré que la sous régulation de c-FLIP conduit la cellule à l'apoptose indépendante du ligand de mort mais DR5-, FADD- et caspase-8- et -9-dépendante, et que cette sous régulation inhibe la prolifération des cellules cancéreuses du sein et déclenche l'apoptose spontanée en activant à la fois le récepteur de la mort et les voies mitochondriales[514]. Enfin, les données de la littérature démontrent tous que l'inhibition de l'interaction de DR5 et de c-FLIP_L par des inhibiteurs puisse fournir un mécanisme par lequel une apoptose sélective tumorale peut être obtenue[515].

d- Ciblage thérapeutique de c-FLIP dans les cancers.

Les travaux réalisés par Safa et al. ont démontré que c-FLIP peut servir de cible critique pour une intervention thérapeutique visant à inhiber sa transcription et les changements post-transcriptionnels[488], [491]. L'expression ectopique des variantes de c-FLIP diminue l'apoptose causée par les ligands de la mort et les agents anticancéreux[510], indiquant que la surexpression de ces protéines peut provoquer une résistance à plusieurs médicaments anticancéreux. Les études sur l'effet de l'inhibition de c-FLIP par des petites molécules sont contradictoires. D'une part, il semble impossible d'inhiber c-FLIP avec des petites molécules, vu la similitude qu'elle possède avec la caspase-8, ce qui fait de c-FLIP une cible thérapeutique très difficile, surtout avec des petites molécules qui bloquent son recrutement dans le DISC et également inhibent le recrutement de la caspase-8, donc inhibent l'apoptose. D'autre part, plusieurs revues ont discuté des classes d'agents qui diminuent l'expression de c-FLIP et sensibilisent les cellules cancéreuses aux thérapies anticancéreuses[488], [490], [491], [516]. Ces agents affectent la transcription de c-FLIP, déclenchent la dégradation de c-FLIP via le système ubiquitine-protéasome ou diminuent la traduction de c-FLIP. Le prétraitement avec des médicaments chimiothérapeutiques, y compris le cisplatine, la doxorubicine ou des

inhibiteurs de la topoisomérase I (camptothécine, 9-NC, irinotécan), diminue l'expression de c-FLIP dans diverses cellules tumorales en inhibant sa transcription et en rendant les cellules sensibles à l'apoptose déclenchée par les récepteurs de mort[517]–[523].

Plusieurs inhibiteurs d'histone désacétylase (HDACi) ont été testés pour leur capacité de réguler l'expression de c-FLIP dans diverses cellules cancéreuses aux niveaux transcriptionnel et traductionnel[491], [524]–[527]. Parmi ceux-ci, l'acide suberoylanilide hydroxamique (SAHA, vorinostat) est le plus prometteur puisqu'il provoque une inhibition robuste des variantes de c-FLIP[524]. Ceci a été démontré dans les cancers de sein où SAHA a amélioré le traitement par TRAIL et l'activation de la procaspase-8. Egalement Safa et al. ont montré qu'un nouveau HDACi, nommé CMH)[526] ou droxinostat[527], déclenche l'apoptose dans la lignée cellulaire de cancer du sein MCF-7 via régulation de la transcription et de la traduction de c-FLIPL et c-FLIPS. Cet agent a induit une apoptose plus robuste dans une variante résistante à la doxorubicine des cellules MCF-7[526].

Une étude réalisée par Murtaza et al. a démontré que le Lupeol, un triterpène alimentaire, a pu induire l'apoptose dans les cancers pancréatiques résistants à la chimiothérapie basée sur TRAIL. Cette induction d'apoptose se passe à travers le clivage de la caspase-8 et accompagnée par une diminution de l'expression protéique de c-FLIP. Dans la même étude, il a été démontré que la combinaison des deux traitements, renforce l'apoptose au-delà des niveaux trouvés lors des mono traitement par TRAIL ou Lupeol à part[528].

Des thérapies à petites molécules qui diminuent l'expression de c-FLIP_S ou c-FLIP_L ont été utilisées dans plusieurs cancers. Le développement de ces stratégies thérapeutiques innovantes en collaboration avec TRAIL et des agents chimiothérapeutiques pourrait potentiellement surmonter la barrière de la toxicité limitant la dose de la chimiothérapie contre le cancer. Parallèlement, La résistance à TRAIL ou à la chimiothérapie dans divers types de cellules

cancéreuses peut être inversée par un traitement parallèle avec des agents connus pour réguler à la baisse les variantes de c-FLIP.

4.2.6. EDA/EDAR et cancers

Le rôle de l'ectodysplasine A1 et de son récepteur a commencé à être récemment exploré dans les cancers solides. Les données présentées dans l'étude la plus récente réalisée par Jonathan Vial et al. au sein du CRCL conforte l'idée qu'EDAR pourrait être envisagé comme un acteur au carrefour entre les membres de la famille TNFR et les récepteurs de la dépendance. En effet, l'étude montre une preuve que, outre sa capacité bien caractérisée pour déclencher l'activation de NF- κ B lors de la liaison du ligand, EDAR induit la mort cellulaire, via un mécanisme dépendant de la caspase, dans un modèle de mélanome. À l'instar des récepteurs de la mort, la mort cellulaire dépendante de l'EDAR est médiée par l'activation de la caspase-8, qui est suffisante en soi pour déclencher l'apoptose dans un type de cellules et nécessite une activation ultérieure de la voie mitochondriale dans un autre. Cependant, et contrairement à ce qui a été rapporté jusqu'à présent pour le TNFR, le réglage de la transition du complexe I anti-apoptotique au complexe II pro-apoptotique semble régulé par la disponibilité des ligands. En effet, l'apoptose induite par EDAR est bloquée de manière dose-dépendante par Eda-A1[481].

En ce qui concerne la signalisation via son domaine de mort, EDAR dispose de sa propre protéine adaptatrice appelée EDARADD différent de FADD qui est nécessaire pour la signalisation apoptotique induite par la plupart des récepteurs de mort. EDARADD semble nécessaire pour les deux signaux induits par EDAR, indiquant que le passage d'un complexe à l'autre doit reposer sur le recrutement en aval de différents partenaires[481].

En d'autres termes, il a été tentant de spéculer que le passage d'un statut tétramérisé en présence de l'Eda-A1 à un monomère en son absence pourrait conduire au recrutement de différents partenaires intracellulaires, déclenchant un passage du complexe conduisant à l'activation de

NF- κ B en présence de l'Eda-A1 d'un côté et la mort cellulaire en son absence de l'autre côté[481].

Outre ses rôles physiologiques, EDAR peut être considéré comme un nouveau suppresseur de tumeur. Son expression apparaît altérée qualitativement et/ou quantitativement dans les biopsies humaines, et ces altérations entraînent probablement une diminution de l'apoptose. Cependant, les études soutiennent le fait qu'EDAR peut agir comme suppresseur de tumeur d'une manière plutôt distincte car l'induction de la mort des cellules tumorales est induite par le retrait du ligand plutôt que par l'engagement du ligand. En conséquence, il est attendu que la perte de l'Eda-A1 induit l'apoptose et la diminution de la croissance tumorale. De même que pour les autres ligands des récepteurs de la dépendance[401], [402], une régulation positive de l'Eda-A1 pourrait être envisagée comme un avantage sélectif pour la croissance tumorale. Son activité oncogène pourrait résulter à la fois de l'inhibition de la mort cellulaire induite par EDAR non lié et de l'activation des gènes via la signalisation classique.

Objectifs de la thèse

Les progrès récents des chimiothérapies conventionnelles, des thérapies ciblées et des anticorps thérapeutiques ont démontré un énorme potentiel thérapeutique dans le traitement des patients. Cependant, l'efficacité du traitement anti-cancer est souvent limitée par divers mécanismes préétablis dans le microenvironnement tumoral tel que les mécanismes immunorégulateurs qui comprennent différentes cellules immunitaires ainsi que des facteurs solubles notamment des ligands sécrétés par les cellules du microenvironnement tumoral ou les cellules cancéreuses elles-mêmes qui influencent leur survie. Pour surmonter cette résistance, les nouvelles thérapies ciblées se concentrent sur la capacité des drogues à rétablir l'apoptose des cellules cancéreuses. Dans les cas généraux, les récepteurs cellulaires doivent se lier à leurs ligands spécifiques afin d'activer une voie de signalisation à l'intérieur de la cellule alors que lorsqu'ils ne sont pas liés à leur ligand, ces récepteurs n'ont aucun effet sur la cellule. Identiquement aux autres récepteurs, en présence de leur ligand, les récepteurs à dépendance induisent la survie et la prolifération de la cellule, mais en l'absence de leur ligand, ces récepteurs induisent l'apoptose. Dans ce dernier contexte, la cellule tumorale a développé deux façons d'échapper à l'apoptose et de proliférer ; dans le premier cas, la cellule diminue l'expression du récepteur et continue ainsi à proliférer sans dépendre du récepteur, dans le second cas, la cellule tumorale commence à sécréter le ligand de manière autocrine et de cette façon, elle reste vivante.

L'option thérapeutique proposée dans notre cas est le développement des anticorps monoclonaux qui captent les ligands des récepteurs dépendants, et par conséquent l'apoptose de la cellule est restaurée.

La nétrine-1 et ses récepteurs DCC et UNC5B sont le premier exemple d'un couple ligand/récepteur à dépendance auquel nous nous sommes intéressés. Comme évoqué précédemment, plusieurs études ont démontré l'implication de ce couple dans la progression des cancers solides et l'intérêt à cibler la nétrine-1 dans ces cancers comme une nouvelle approche thérapeutique contre le cancer. Nos résultats préliminaires ont démontré que ce couple

est surexprimé dans deux types d'hémopathies, le lymphome non hodgkinien et le myélome multiple. Tout d'abord on a **évalué l'effet du ciblage de la nétrine-1 par un anticorps monoclonal humanisé anti- nétrine-1 (ou NP137) sur la viabilité cellulaire d'un modèle cellulaire *in vitro* ainsi que sur la croissance tumorale dans un modèle de lymphome préclinique.** En parallèle, nous avons pu démontrer l'expression de la nétrine-1 et de ses récepteurs chez les patients atteints de myélome multiple et dans cette optique nous avons **exploré le rôle et l'effet du ciblage de la nétrine-1 et de ses récepteurs dans les myélomes multiples.**

L'ectodysplasin A1 et son récepteur EDAR sont le deuxième couple ligand/récepteur à dépendance auquel on s'intéresse dans notre étude. Peu d'études ont décrit l'implication de ce couple dans les cancers toutefois, les données du TCGA indiquent que ce couple est surexprimé dans les leucémies aiguës myéloblastiques. De ce fait nous avons **évalué la valeur pronostique de EDAA1/EDAR dans une cohorte de patients atteints de LAM et également l'effet du ciblage de EDAA1 dans des modèles de cellules LAM.**

Résultats

Chapitre I : Expression de la nétrine-1 dans les hémopathies et exploration de son rôle dans le Lymphome non-hodgkinien.

Introduction

La résistance à la mort cellulaire par inhibition des signalisations pro-apoptotiques ou l'activation constitutive des voies anti-apoptotiques est généralement considérée comme une étape importante vers la progression tumorale[529]. Historiquement, plusieurs gènes dont le Bcl-2 ont été caractérisés comme des protéines anti-apoptotiques ou comme des facteurs impliqués dans la régulation de l'équilibre entre la mort cellulaire et la survie cellulaire qui agissent comme des oncogènes dans le lymphome [530]–[533]. Le lymphome à cellules B est un sous-groupe hétérogène de néoplasmes lymphoïdes, qui proviennent de cellules B à différents stades de différenciation et sont classés en entités spécifiques en fonction de leurs caractéristiques cliniques, histologiques, immunologiques et génétiques.

La nétrine-1 et ses récepteurs DCC et UNC5B jouent un rôle crucial durant le développement. Cependant leur rôle chez l'adulte a été récemment étudié surtout après avoir découvert le rôle de ces protéines dans l'induction de l'apoptose et la régulation de la survie cellulaire. Ponctuellement, DCC est un récepteur transmembranaire, qui déclenche activement la mort cellulaire en absence de son ligand nétrine-1, fonctionnant ainsi comme un récepteur à dépendance[378], [534]. Ainsi, le DCC pourrait agir comme un suppresseur de tumeur conditionnel en déclenchant l'apoptose des cellules dans lesquels il est surexprimé et lorsque la présence de nétrine-1 dans l'environnement est limitée. Dans ce contexte, il a été récemment prouvé que la sous régulation de DCC ou l'invalidation de sa signalisation négative par introduction d'une mutation ponctuelle D1290N est associée à la progression de la tumeur du sein et colorectale respectivement dans deux modèles de souris mutantes[428], [535]. En 2016, les travaux de Laura Broutier au sein de l'équipe de Patrick Mehlen au CRCL, ont démontré un déséquilibre au niveau de l'expression de nétrine-1 et de DCC dans les lymphomes humains et

que le ciblage de la nétrine-1 avec un anticorps monoclonal humanisé anti-nétrine-1 produit dans une nouvelle entreprise start-up (NetrisPharma à Lyon) dans un modèle cellulaire et préclinique de lymphomes, peut diminuer la croissance tumorale en induisant l'apoptose[436]. Récemment, une étude a démontré l'implication de la nétrine-1 et DCC dans des modèles cellulaires et précliniques de mélanome[536]. Par ailleurs, très peu d'études ont abordé l'expression et le rôle de la nétrine-1 dans les hémopathies.

Dans cette partie, nous évoquerons nos découvertes sur l'expression de la nétrine-1 et de ces récepteurs dans les différents types d'hémopathies ainsi que le rôle de ces protéines dans des modèles cellulaires et préclinique de lymphome non-hodgkinien. Nous aborderons également, l'effet de la surexpression de la nétrine-1 dans un modèle de NHL sur la prolifération cellulaire *in vitro* ainsi que sur la croissance tumorale *in vivo*.

Matériels et méthodes

1. Culture cellulaire

Les lignées cellulaires hématologiques humaines suivantes ont été obtenues auprès de l'ATCC (American Type Culture Collection): RL (lymphoblaste B), TMD-8 (DLBCL), Daudi (lymphome B), Molt-4 (lymphoblaste T), CEM (lymphoblaste T), REH (lymphoblaste), Jurkat (lymphoblaste T), HEL (leucémie aiguë myéloïde), HL60 (leucémie aiguë myéloïde), Kasumi-1 (leucémie aiguë myéloïde), MM1S (myélome multiple), RPMI8226(myélome multiple) et DSMZ (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH) : Granta-519 (lymphome à cellules du manteau), DoHH2 (lymphome B), AMO-1(myélome multiple), LP-1 myélome multiple), OPM- 2(myélome multiple), U266 (myélome multiple). Ces lignées cellulaires ont été cultivées dans du RPMI-1640 (sigma Aldrich) supplémenté avec (10% de FBS, 2 mM de L-glutamine, 100 U / ml de pénicilline et 100µg/ml de streptomycine tous de Sigma Aldrich). Toutes les cellules ont été maintenues dans 5% de CO₂ à 37 °C.

Les lignées cellulaires A549wt et A549-nétrine-1 (adénocarcinome pulmonaire) ont été obtenues de NetrisPharma. A549-nétrine-1 est une lignée modifiée par transfection avec pcDNA3 codant pour la nétrine-1, surexprimant la nétrine-1.

2. Etude de l'expression génique de la nétrine-1, de DCC et de UNC5B par RTqPCR

2.1. Matériels

Kit d'extraction d'ARN Qiagen (réf: Cat No./ID: 74104). Kit de transcription inverse contenant : 1 tube contenant 1 ml de tampon 5X (Tris-HCl 250 mM (pH 8,3), KCl 375 mM, MgCl₂ 15 mM); 1 tube contenant 500 µl de DTT à 0,1 M et 1 tube contenant 200 µl de transcriptase inverse M-MLV à 200 U / µl (référence Invitrogen Thermofisher du kit: 28025). Mélange dNTP (10 mM chacun) (Invitrogen Thermofisher réf.: 18427013), Random Primers (3 µg/µl) (Invitrogen Thermofisher réf. 48190011). Eau DEPC. Kit maître SybrGreen ® (Eurogentec: UF-NSCT-B0201). Plaques PCR Thermofisher 96 puits (réf. AB0900W). Les séquences des amorces spécifiques de nétrine-1, UNC5B et DCC sont données dans le tableau 6 et disponibles sur demande.

2.2. Méthodes

2.2.1. Extraction d'ARN

1.

6.

1.

Remarque : le cycle de seuil (Ct) pour le gène domestique 28S doit être supérieur à 6 et la différence entre les cycles de seuil pour 28S d'échantillons différents doit être inférieure à 2 cycles. De plus, le cycle seuil (Ct) pour les gènes d'intérêt ne doit pas dépasser 35.

Mélange de qPCR		
2.9 µl master mix, 0.4 µl (concentration finale 0.1-0.5µM) de chaque amorce (forward et reverse), 1.3 µl de H2O.		
Amorces		
	Forward primer	Reverse primer
Nétrine-1	GCCCTGGAGAAATGACGAGA	

PVDF (Invitrogen iBlot réf. IB24001). Les anticorps de lapin anti-nétrine-1 (Abcam ab126729), anti-DCC (BosterBio PA1910), anti-UNC5B (D9M7Z mAb # 13851). Un anticorps de souris anti- β -actine (Thermofisher réf. A5441). Les anticorps secondaires anti-souris (IRDye® 680RD Goat anti-Mouse IgG Secondary Antibody réf.926-68070) et anti-lapin (IRDye® 800CW Chèvre anti-lapin IgG secondaire réf. 926-32211). Tampon de blocage Odyssey (préparé dans du PBS) (Licor ref.927-40000). Tween 20 (Sigma réf.11332465001).

3.2.Méthodes.

3.2.1. Culots cellulaires.

3.2.1.1.Cellules en suspension.

- 1.

3.

5.

Pour les protéines de taille <50 kDa : programme 3 (20 V) pendant 3 min. Pour les protéines de tailles comprises entre 50 et 80 kDa : programme 3 (20 V) pendant 4 min. Pour les protéines de taille > 80 kDa : programme 3 (20 V) pendant 5 min.

3.2.6. Immunomarquage et révélation

- 1.

10.

9.

1.

8.

Kit de marquage Annexin-V-FLUOS (Roche Cat. No. 11 988 549 001). HEPES (Thermo scientific ref.15630080). PBS 1X (Thermo scientific ref. 10010023).

6.2.Méthode.

- 1.

7.

7.2.2. Jour 3 : sélection des cellules à la généticine

1.

5.

multiples (Figure 11A). En revanche, l'expression protéique de la nétrine-1 n'était pas validée par western blot que dans les lymphomes non-hodgkiniens de types LCM et DLBCL représentés par les lignées cellulaires Granta-519 et TDM8 respectivement, et dans les myélomes multiples (LP1, RPMI8226 et MM1S) (Figure 11B). L'expression protéique des récepteurs de la nétrine-1 était plus élevée aussi dans ces deux types d'hémopathies. Ces résultats suggèrent que les LCM, les DLBCL et les myélomes multiples peuvent être compatibles avec le traitement anti-nétrine-1.

Le traitement anti-nétrine-1 réduit la viabilité cellulaire d'un modèle cellulaire de LNH

Afin d'étudier l'effet du ciblage de la nétrine-1 dans un modèle de lymphome non hodgkinien, nous avons choisi la lignée cellulaire Granta-519 parmi les différentes lignées de LNH et nous l'avons traité dans le modèle de co-culture mis en place, dans trois différentes conditions : seules, co-incubées avec des cellules représentant le microenvironnement (A549wt) ou co-incubées avec des cellules qui surexpriment la nétrine-1 (A549nétrine-1). Ces cellules adhérentes représentent un microenvironnement qui secrètent abondamment la nétrine-1. Ceci sert à évaluer l'effet autocrine et paracrine de la nétrine-1. Les résultats de l'analyse de la viabilité cellulaire analysée par cytométrie en flux après marquage à l'annexinV/IP (Figure 12) montrent une diminution significative de la viabilité cellulaire des Granta-519 cultivées seuls après traitement par NP137. Egalement, les résultats obtenus montrent que la viabilité des Granta-519 co-cultivées avec les A549wt ou les A549nétrine-1 diminue significativement après traitement par NP137 dans différentes conditions. Cependant, la viabilité des Granta-519 augmente d'une façon non significative lorsqu'elles sont co-cultivées avec des cellules adhérentes. Toutefois, les Granta-519 co-cultivées avec les A549nétrine-1 subissaient une baisse de viabilité plus importante, après traitement par NP137, que celles co-cultivées avec A549wt (Figure 12). Ces résultats indiquent que le NP137 est suffisamment efficace pour neutraliser à la fois la sécrétion autocrine et paracrine de la nétrine-1 dans le

microenvironnement des cellules Granta-519 et que le blocage de la nétrine-1 dans ces conditions est suffisant pour l'induction de l'apoptose.

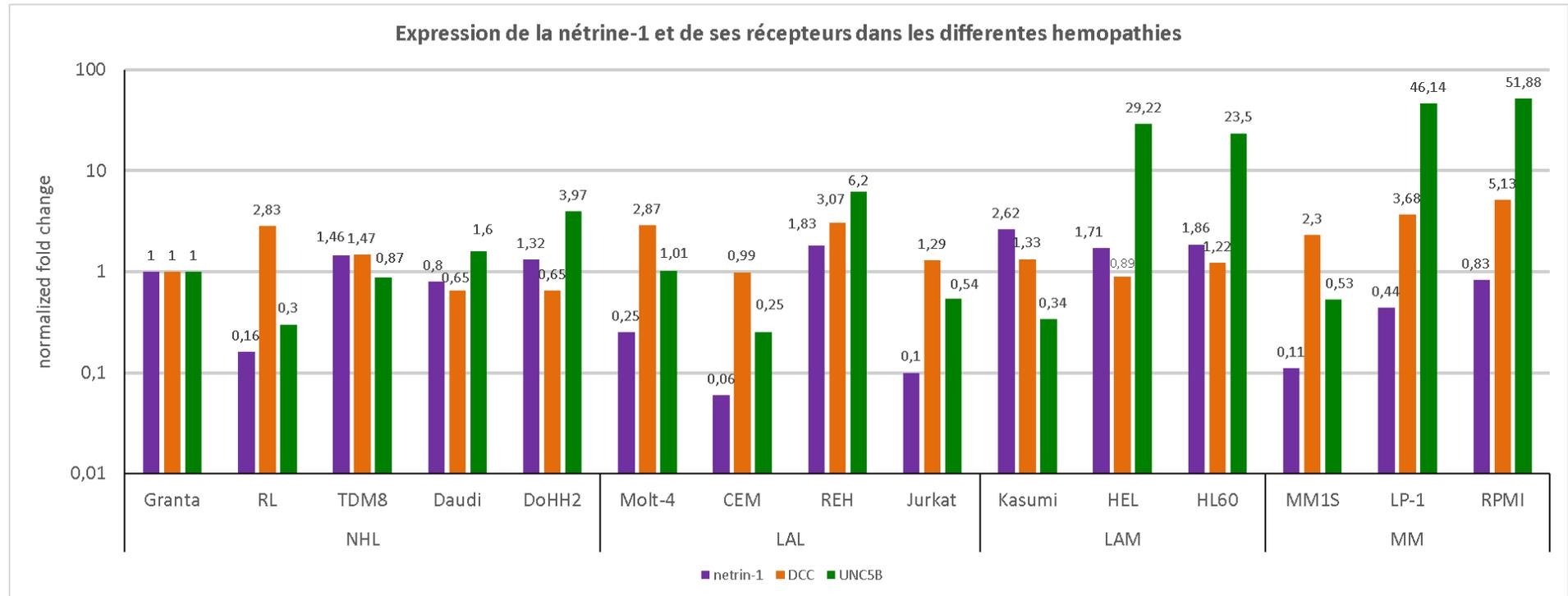
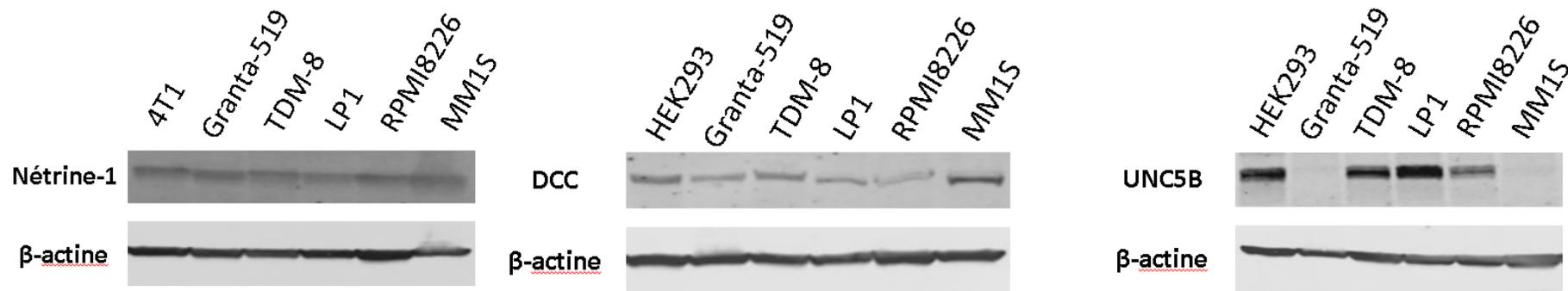
A**B**

Figure 11 : expression de la nétrine-1 et ses récepteurs DCC et UNC5B dans les hémopathies malignes.

(A) expression transcriptionnelle, évaluée par RT-qPCR (*expérience représentative des 3 expériences réalisées*). (B) expression protéique, évaluée par western blot (*expérience représentative des 3 expériences réalisées*). NHL : lymphome non-hodgkinien. LAL : leucémie aiguë lymphoblastique. LAM : leucémie aiguë myéloïde. MM : myélome multiple.

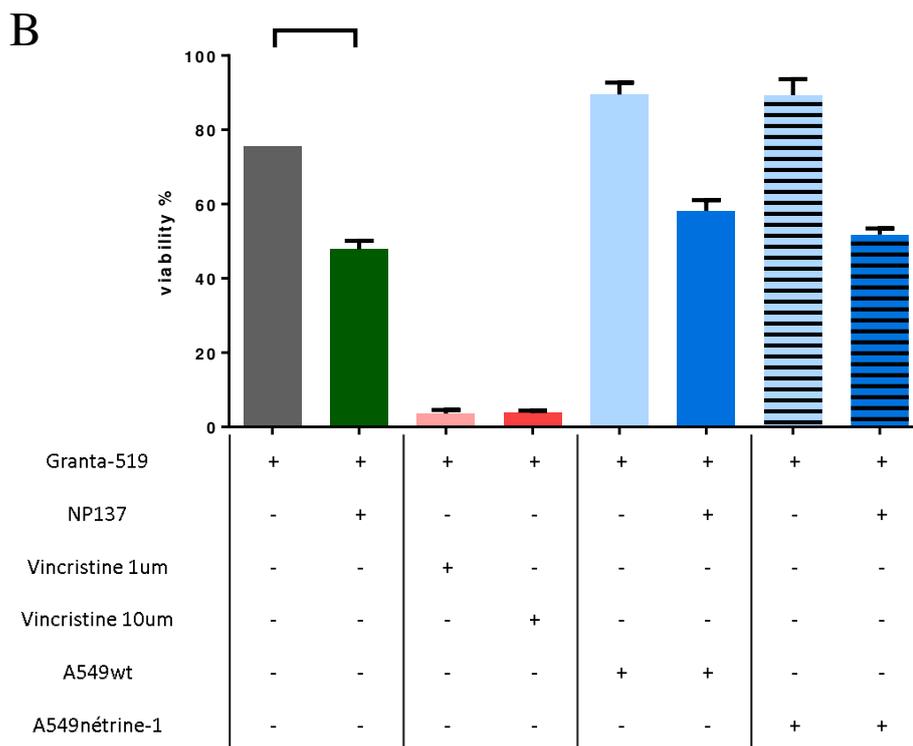
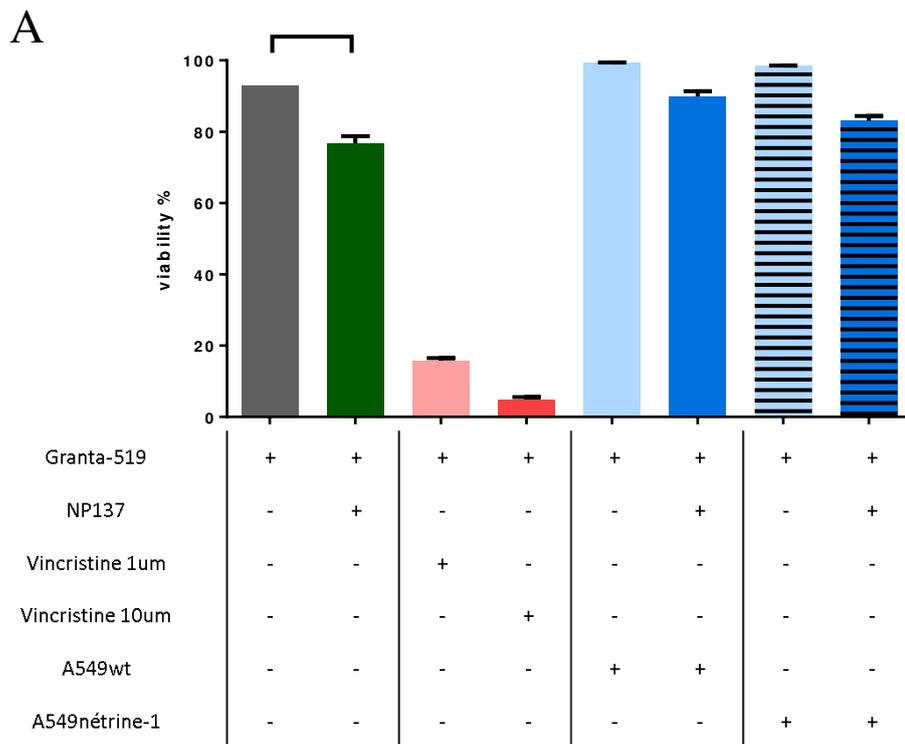


Figure 12 : évaluation de l'effet de NP137 (anti-nétrine-1) sur la viabilité des cellules d'une lignée de LNH (Granta-519) par cytométrie en flux après marquage à l'annexinV/IP en système de coculture. (A) résultats de la viabilité des cellules cultivées dans du RPMI1640 et (B) résultats de la viabilité des cellules cultivées dans du DMEM. (Ratio Granta-519 :A549wt ou nétrine-1 = 1 :5) * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Le traitement anti-nétrine-1 réduit la croissance tumorale de LNH dans un modèle préclinique

Afin d'étudier l'effet du traitement anti-nétrine-1 sur les LNH, des cellules de la lignée Granta-519 sont greffées par voie sous cutanée dans des souris CB17-SCID. La croissance tumorale est ensuite suivie et le traitement par l'anti-nétrine-1 commence dès que la tumeur atteint 100mm^3 . Les résultats du suivi du volume tumoral (Figure 13) montrent une baisse de la croissance de la tumeur dans le groupe des souris traitées avec le NP137 par rapport au souris non traitées à partir du troisième traitement.

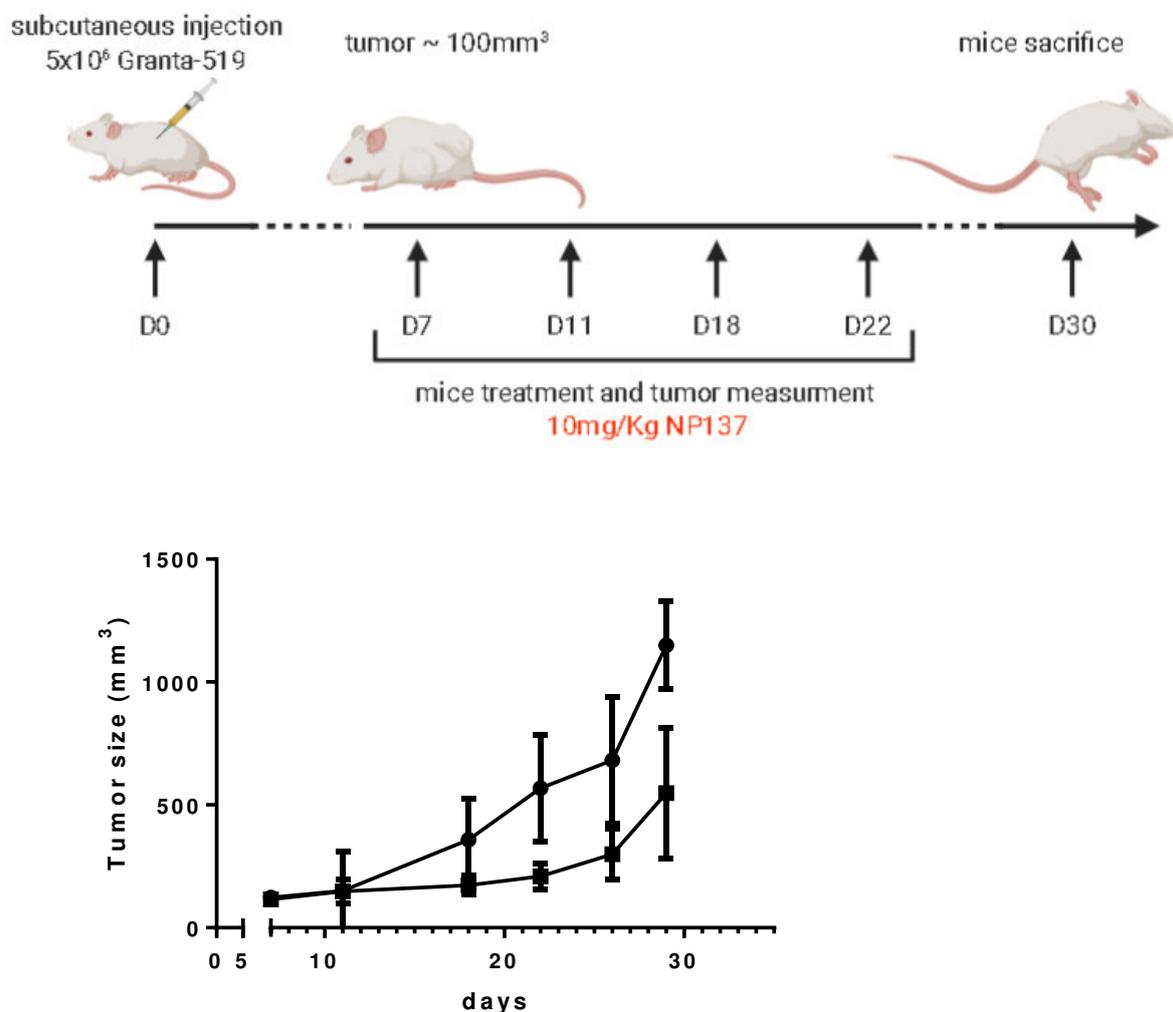


Figure 13 : évaluation de l'effet de l'anti-nétrine-1 sur la croissance tumorale de Granta-519 dans un modèle préclinique. Les souris sont divisées en deux groupes (4souris/groupe) ; groupe non-traité et groupe traité par NP137.

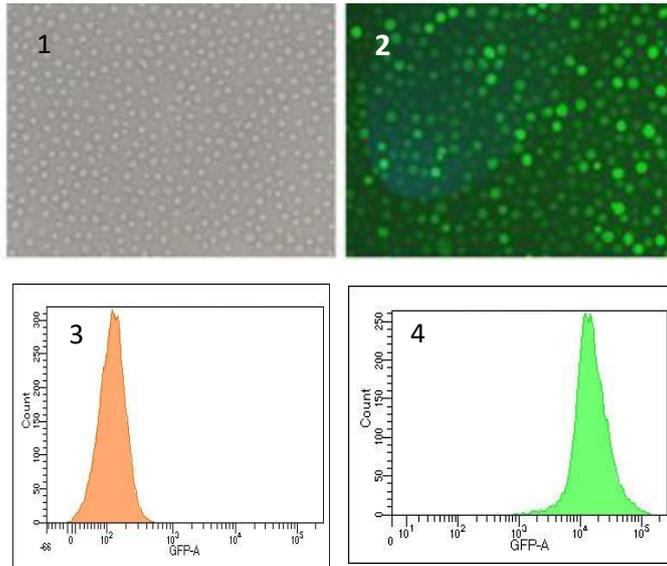
Evaluation de l'effet de la surexpression de la nétrine-1 dans deux modèles de LNH.

Pour évaluer l'effet de la surexpression de la nétrine-1 sur la prolifération cellulaire et la croissance tumorale, nous avons établi deux modèles de lymphomes (dérivés des lignées Granta-519 et RL), qui sur-expriment la nétrine-1 par transfection à l'aide d'un plasmide codant pour la nétrine-1 humaine. La transfection par sonoporation a été tout d'abord validée à l'aide d'un contrôle de transfection (GFP) créé en parallèle (Figure 14A). Par suite, l'expression de la nétrine-1 a été validée par RT-qPCR et par western blot. Les résultats montraient une surexpression de la nétrine-1 aux niveaux transcriptionnel et protéique dans les cellules transfectées par le plasmide codant pour la nétrine-1 par rapport aux cellules transfectées par le plasmide vide (Figure 14B).

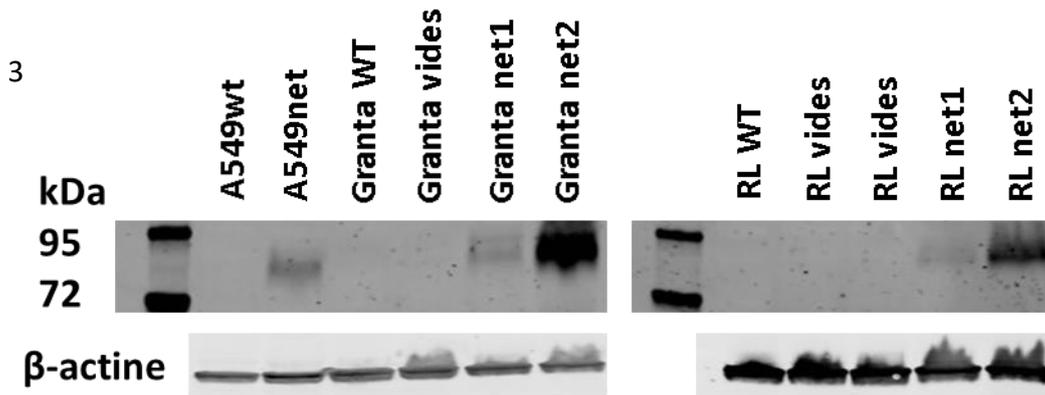
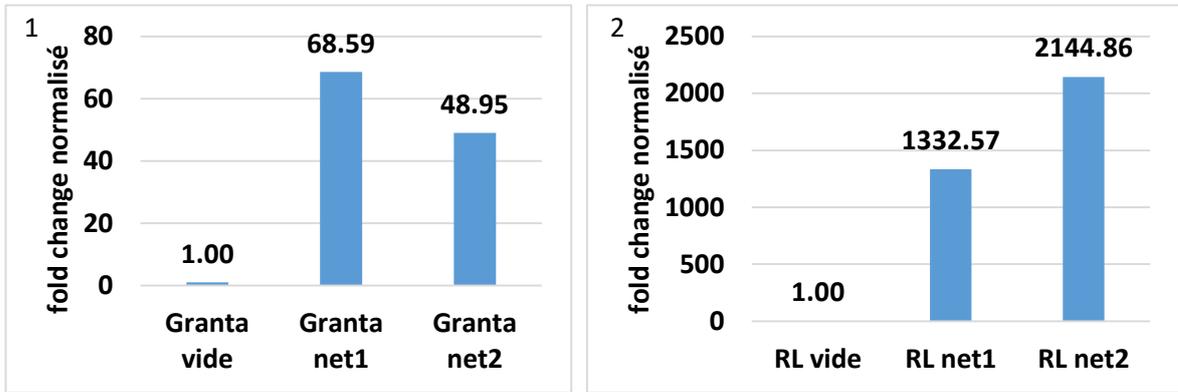
De ce fait, la prolifération cellulaire des cellules Granta-519 a été ensuite évaluée à l'aide du suivi de la fluorescence des cellules, sur 4 jours, par cryométrie en flux marquage après marquage au CFSE. Les résultats montrent que les cellules Granta-519 transfectées par la nétrine-1 prolifèrent plus rapidement que les cellules contrôles (transfectées par le plasmide vide) (Figure 14C).

Ensuite, nous avons voulu évaluer l'effet de la surexpression de la nétrine-1 sur la croissance tumorale des tumeurs Granta-519 et RL dans un modèle préclinique. Pour cela nous avons greffé, par voie sous-cutanée, les cellules transfectées que nous avons générées dans des souris CB17-SCID. Les souris sont ensuite traitées par l'anti-nétrine-1 et la croissance tumorale a été suivie. Les résultats du suivi du volume tumoral des tumeurs Granta-519 et RL (Figure 14D) montrent que les tumeurs qui surexpriment la nétrine-1 poussent moins rapidement que les tumeurs contrôles.

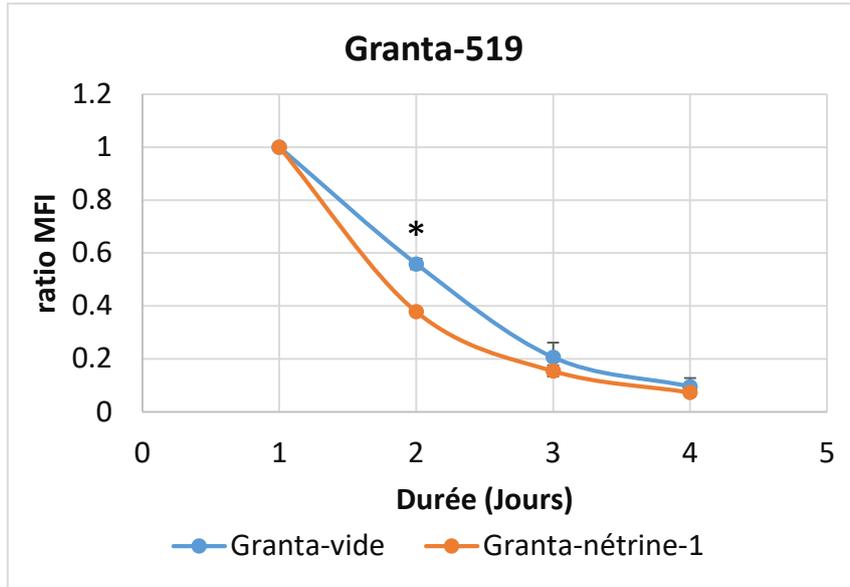
A



B



C



D

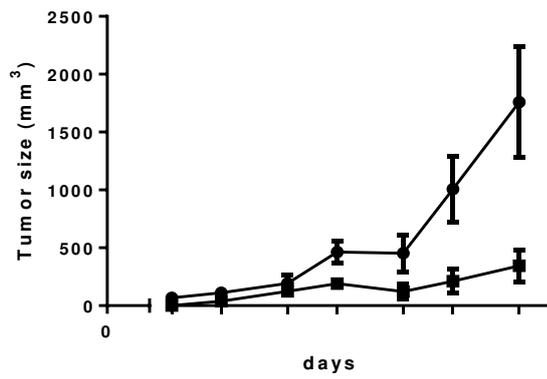
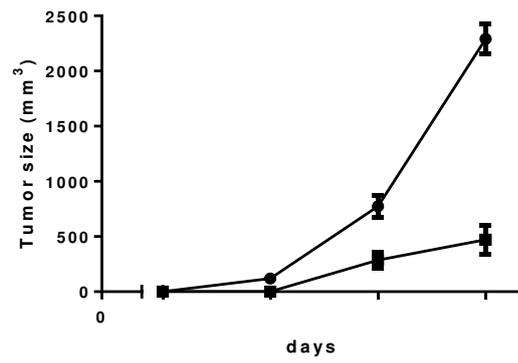


Figure 14 : évaluation de l'effet de la surexpression de la nétrine-1 dans des modèles cellulaires de lymphome (Granta-519 et RL)

(A) vérification de la fluorescence des cellules RL-GFP contrôles de transfection par microscopie à fluorescence (1 : lumière blanche et 2 : laser) et cryométrie en flux (3 : RL transfectées par le plasmide contrôle et 4 : RL transfectées par plasmide GFP). (B) évaluation de l'expression de la nétrine-1 dans les modèles cellulaires générés par RT-qPCR (1 : deux répliques biologiques de Granta-519 nommés Granta net1 et Granta net2 et 2 : deux répliques biologiques de RL nommés RLnet1 et RLnet2) et western blot (*Expériences réalisées 1 fois*). (C) analyse de la prolifération cellulaire de Granta-519 (transfectées par le plasmide contrôle ou par le plasmide codant pour la nétrine-1) par cytométrie en flux après marquage au CFSE (*N=3 représentation de la moyenne des triplicats*). (D) évaluation de la croissance des tumeurs de LNH transfectées par le plasmide contrôle ou le plasmide codant pour la nétrine-1 dans un modèle préclinique de souris CB17-SCID (3 souris/groupe) (*expérience réalisée 1 fois*) (les répliques Granta net2 et RLnet2 sont choisis après vérification de la surexpression de la nétrine-1 par western blot).

Discussion

Dans ce chapitre nous avons étudié l'expression de la nétrine-1 et de ses récepteurs majeurs dans des lignées représentatives de différentes hémopathies malignes. Nos observations suggèrent que cette voie de signalisation pourrait être importante dans les lymphomes à cellules du manteau ainsi que dans les myélomes.

DCC a été tout d'abord considéré comme l'un des suppresseurs de tumeurs les plus importants [537], [538], et plusieurs études reconduites ont renouvelé l'intérêt du DCC pour contrôler la progression tumorale. DCC a récemment été identifié comme le troisième gène le plus fréquemment muté dans le mélanome causé par l'exposition excessive au soleil [539], et son activité de suppression des tumeurs a été établie à l'aide de deux modèles de souris différents [428], [535]. Notre travail suggère que l'inhibition spécifique de l'apoptose induite par le DCC est suffisante pour induire la mortalité dans un modèle de LCM appartenant à la famille des LNHs.

Le lymphome à cellules du manteau est une maladie rare représentant 6 à 8% de tous les lymphomes et se caractérise chez la plupart des patients par une translocation à (11; 14) (q13; q32) conduisant à une surexpression de la cycline D1 [540]. Il est souvent diagnostiqué dans

des stades tardifs. Le lymphome folliculaire est le deuxième type le plus courant de lymphome non hodgkinien (LNH). S'ajoutant au fait que des modèles cellulaires de ces deux types d'hémopathies expriment la nétrine-1 et ces récepteurs, ces facteurs constituent une bonne raison pour découvrir de nouvelles approches thérapeutiques pour ces hémopathies.

Une étude réalisée en 2016 au sein de l'équipe de Patrick Mehlen, a déjà démontré l'intérêt de cibler les couples récepteurs/ligands à dépendance dans les hémopathies de type lymphome non-hodgkinien, précisément dans le lymphome diffus à grandes cellules B et les lymphomes à cellules du manteau. Ici, nous avons réussi tout d'abord à mettre en évidence avec succès l'expression protéique de la nétrine-1 et de DCC dans Granta-519 et TDM8, deux modèles représentatifs de LCM et de DLBCL respectivement ainsi que dans LP1, MM1S et RPMI8226, des modèles représentatifs de myélome multiple. Les résultats obtenus suggèrent aussi que le traitement anti-nétrine-1 est efficace dans le cas du LCM ; même si la viabilité des Granta-519 augmente d'une façon non significative en présence des cellules adhérentes, le NP137 réduisait la viabilité de la lignée de LNH significativement même dans des conditions extrêmes d'expression autocrine et paracrine de nétrine-1. De plus, la réduction de la croissance tumorale dans un modèle préclinique de lymphome à cellules de manteau après traitement par l'anti-nétrine-1 dans est bien corrélée au résultats obtenus *in vitro*. En revanche, *in vitro* le traitement anti-nétrine-1 n'avait pas le même effet sur la viabilité dans le cas des lymphomes folliculaires (données non représentées).

En outre, nos résultats suggèrent que la surexpression de la nétrine-1 dans un modèle de lymphome à cellules du manteau augmente la prolifération cellulaire, corrélant nos résultats à ce qui a été observé durant l'étude réalisée en 2016 qui suggérait un glissement vers la suppression de l'apoptose induite par DCC chez une fraction de patients souffrant d'un LNH, soit par perte d'expression de DCC, soit notamment par gain de nétrine-1, ou par un système intermédiaire dans lequel les deux événements se produisent. Ceci montre que le gain de

nétrine-1 est un événement pro-oncogène, car la nétrine-1 se comporte comme un facteur de survie pour les cellules tumorales. Cependant notre modèle de co-culture dans lequel l'effet du traitement anti-nétrine-1 est accentué en présence des cellules présentant le microenvironnement qui secrète abondamment la nétrine-1 suggère que ce traitement est plus efficace dans des conditions extrêmes de sécrétion de nétrine-1. Alors que la surexpression de la nétrine-1 doit théoriquement accélérer la croissance tumorale, nos résultats de l'analyse de la croissance des tumeurs qui surexpriment la nétrine-1 ne montrent pas une accélération de la croissance des tumeurs par rapport aux tumeurs contrôles suggérant un changement potentiel du phénotype des cellules cancéreuses, mettant en jeu leur expression de nétrine-1, après leurs greffages *in vivo*.

Finalement, la mise en évidence de l'expression de la nétrine-1 dans les hémopathies ouvre de nouvelles perspectives thérapeutiques pour ce type de cancer et si les résultats obtenus sur le ciblage de la nétrine-1 dans le LCM sont confirmés, les anticorps ciblant la nétrine-1 seraient alors un traitement à considérer dans ce type de lymphome.

Chapitre II : Expression et ciblage de la nétrine-1 dans le myélome multiple.

Dans ce chapitre nous aborderons le rôle et l'implication de la nétrine-1 dans les myélomes multiples. Nous évaluerons l'expression de la nétrine-1 dans les lignées cellulaires ainsi que dans les échantillons de patients atteints de myélomes multiples. Egalement nous étudierons l'effet du ciblage de la nétrine-1 à l'aide d'une thérapie unique en son genre dans des modèles cellulaires in vitro et in vivo dans des modèles précliniques.

Si on la compare avec l'évocation du rôle de la nétrine-1 durant le développement, l'étude du rôle de la nétrine-1 dans les cancers demeure un nouveau sujet de recherche sur lequel peu est connu surtout en hématologie. Comme évoqué précédemment, la nétrine-1 agit comme une clé à dépendance qui, lors de sa présence, induit la multimérisation de DCC et la dimérisation de UNC5B. L'activation de ces récepteurs par la nétrine-1 induit des signaux de survie et inhibe l'apoptose. Cette induction des signaux de survie peut être inversée en absence du ligand, par suite les récepteurs clivés induiront des séries d'interactions protéiques menant finalement à l'activation de la voie des caspases indépendamment de la voie mitochondriale. Dans ce contexte, l'étude de l'implication de la nétrine-1 dans l'initiation, la progression tumorale et l'angiogenèse est désormais plus intéressante pour pouvoir mieux comprendre l'évolution des cancers mais aussi pour développer des nouveaux outils thérapeutiques. Les études du ciblage de la nétrine-1 par un anticorps spécifique, le NP137, sont désormais au stade des essais cliniques pour certains types de cancers solides. Dans cette étude nous avons profité de la collaboration avec l'équipe de Patrick Mehlen afin d'évaluer l'effet du blocage de la nétrine-1 pour la première fois dans les hémopathies et précisément dans les myélomes multiples.

Suite aux résultats d'un premier criblage de lignées d'hémopathies qui a montré une hausse de l'expression de la nétrine-1 et de ses récepteurs dans les myélomes multiples, nous avons en

premier temps évaluer l'expression de ces protéines dans des échantillons de moelle osseuse isolés des patients atteints de myélomes multiples. Les résultats obtenus validaient l'expression des protéines d'intérêt dans ce type d'hémopathies, pour cela, nous avons élargi notre panel de lignées cellulaires de myélomes multiples afin d'isoler les meilleures lignées pour notre étude. Nos résultats suggèrent que le traitement anti-nétrine-1 réduit significativement la viabilité cellulaire en le combinant avec des agents chimiothérapeutiques cytotoxiques dans deux modèles cellulaires RPMI8226 et MM1S. Parallèlement, nos découvertes montrent que ce traitement anti-nétrine-1 est capable de réduire significativement la croissance tumorale de RPMI8226 dans un modèle préclinique lorsqu'il est combiné à la dexaméthasone. Par contre, ceci n'était pas le cas pour les tumeurs MM1S traitées avec bortezomib en combinaison avec le NP137. Les résultats préliminaires obtenus sur le traitement ex vivo des échantillons frais de myélome multiple provenant des patients montraient dans certains cas une baisse non significative de la viabilité des plasmocytes lors du traitement en combinaison.

Netrin-1 expression and targeting in multiple myeloma

FAHED David¹, CHETTAB AbdelKamel¹, MATHE Doriane², TOURETTE Anne², DENIS Morgane², TRAVERSE-GLEHEN Alexandra³, KARLIN Lionel³, PERRIAL Emeline¹, DUMONTET Charles^{1,2,3}.

¹Anticancer Antibodies Team, CRCL, INSERM U1052, CNRS UMR5286, CLB, UCBL, Lyon, France

²Antineo, Lyon, France

³Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

Abstract

Deleted in colorectal cancer (DCC) and uncoordinated-5 (UNC5) receptors, play a key role in tumor progression of several solid tumors by inducing apoptosis when unbound to their ligand netrin-1. Netrin 1 is currently being evaluated as a therapeutic target. These receptors, known as dependence receptors, and their ligands, have not yet been extensively explored in hematological malignancies.

Here, we performed a screening of various human myeloma cell lines and bone marrow samples from multiple myeloma patients for netrin-1 and its receptors to determine the expression of netrin 1 and its receptors in multiple myeloma as well as to assess the potential anti-myeloma activity of a novel anti-netrin-1 treatment (NP137).

Our results showed heterogeneous expression netrin-1 and its receptors DCC and UNC5H2(B) in six human myeloma lines. Additionally, immunohistochemistry and flow cytometry showed expression of these molecules in a majority of myeloma patient samples. In vitro NP137 did not induce apoptosis of myeloma cell lines yet enhanced the cytotoxicity of bortezomib and dexamethasone. In vivo, NP137 treatment of SCID mice with established RPMI8226 myeloma tumors led to a reduction of tumor size compared to controls. *Ex vivo*, NP137 lowered the

plasma cells percentage in bone marrow aspirates in a fraction of the patient samples analyzed. These results suggest that netrin signaling could constitute a novel therapeutic target in multiple myeloma.

Introduction

Netrin-1 was first described as a secreted axon guidance protein.(1) UNC5 (UNCoordinated 5), one of its receptors, was discovered in *C. elegans* while studying the development of the nervous system.(2) The best described receptor of netrin-1, DCC (Deleted in Colorectal Cancer) was found to be involved in colorectal cancer development. Along with its receptors, netrin-1 plays a crucial role in the nervous system and several studies investigated the role of this pathway in diseases such as Parkinson's disease, Alzheimer's disease (3–5) and others.

During the 90s, it was shown that netrin-1 and its receptors, DCC and UNC5, are dysregulated in many types of cancer (6–8). Later, it has been demonstrated that netrin-1 and its receptors regulate the homeostasis of the cells outside of the central nervous system, similarly to what has been shown in the epithelium of the colon where cells in the bottom of the crypt express highly netrin-1 to avoid apoptosis (9). DCC has been described to be a conditional tumor suppressor gene since it normally prevents cell growth in the absence of netrin-1(10). DCC has also been explored as a diagnostic and prognostic marker in several tumor types. In breast cancer a high level of expression in patient samples, evaluated by immunohistochemistry, is associated with reduced overall survival (11,12). In addition, several studies have shown that this receptor can undergo loss of heterozygosity in certain types of cancers like colorectal cancer, prostatic and gastric carcinomas (6,13,14). This loss of heterozygosity not only helps to transform a normal cell into a cancer cell but also can promote existing tumor growth (15). When DCC is present and not activated by netrin it is proapoptotic, and represses tumour formation. When DCC is activated by netrin-1, it promotes cell survival, acting as an oncoprotein(16).

In the absence of netrin-1, the intracellular domain of DCC is cleaved by intracellular caspase-9 and caspase-3, thereby inducing apoptosis. This intracellular domain does not correspond to a known caspase recruitment motif or death domain, but is required to initiate apoptosis. (10,17) It has been suggested that this domain acts as a scaffold to form a complex that leads to the recruitment and the activation of caspase-9 and caspase-3. In this scenario, DCC-induced apoptosis is not dependent on either the mitochondrial apoptosis or the death receptor/caspase-8 pathway (17). This suggests that DCC regulates a pathway that activates caspases independently of the formation of an apoptosome or cytochrome c release (16).

Given the role of netrin 1 signaling in several solid tumor types, we investigated the relevance of this signaling pathway in multiple myeloma. Our results suggest that netrin 1 signaling is present in a subgroup of myeloma cell lines as well as patient samples, and that this pathway is amenable to inhibition with an anti-netrin 1 antibody.

Materials and methods

Cell lines

Hematological cell lines were obtained from ATCC (MM1S, RPMI8226) and DSMZ (AMO-1, LP-1, OPM-2, U266). All cell lines were cultured in RPMI-1640 supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 2mM L-glutamine, 100U/ml penicillin and 100ug/ml streptomycin (all from Sigma Aldrich). All cells were maintained in 5% CO₂ at 37°C.

RTqPCR

Total RNA from myeloma cell lines (AMO-1, LP-1, MM1S, OPM-2, RPMI8226 and U266) was extracted using Qiagen RNA extraction kit (ref. Cat No./ID: 74104) and reverse transcription was performed using reagents obtained from Invitrogen (Thermofisher) (5X buffer [250 mM Tris-HCl (pH 8.3), 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂] with 500 µl 0.1 M DTT, dNTP Mix (10 mM ea), random primers, M-MLV Reverse Transcriptase). Expression of

netrin-1, DCC and UNC5H2(B) was assessed by real-time quantitative RT-PCR with specific primers (supplementary table S1), on a LightCycler 480 apparatus (Roche) using the SybrGreen® Master kit (Roche). Reaction conditions were set for optimal amplification of each gene. Quantification of gene expression was determined by calculating the difference between the number of cycles of the studied gene from different samples and a control sample (cell line) and then calculating the difference of cycles of a housekeeping gene (here ribosomal 28S) between the number of cycles from different samples and the same control sample (cell line) and finally apply the rule of $2^{-\Delta \Delta C_T}$ to calculate the normalized fold.

Western Blot

Cells were washed with PBS and pelleted. Total protein extraction was performed using lysis buffer A (Tris-HCl pH6.8 20mM, MgCl₂ 1mM, EGTA 2mM and NP40 0.5%) to which a protease inhibitor cocktail was added. The total extract was then centrifuged at 12000g for 15 minutes at 4°C. The supernatant was then conserved at -80°C or directly dosed by Coomassie Brilliant Blue method using a BSA standard scale. Proteins were then denatured and mixed with β-mercaptoethanol 1X and migration was performed on a precast gel from Biorad (mini-Protean TGX stain-Free Precast Gels) at 120V. Proteins were then transferred to a PVDF membrane (Invitrogen iBlot transfer stack), which was incubated for 30 minutes with blocking buffer and then overnight with primary antibodies (anti-netrin-1 from Abcam ab126729 at 1:1000, anti-DCC from BosterBio PA1910 at 1:500 and anti-unc5b from cell signaling D9M7Z Rabbit mAb #13851 at 1:500). The membranes were then washed with PBS Tween20 0.1% (sigma P1379) and incubated with secondary antibodies (anti-mouse or anti-rabbit at 1:5000), and then scanned using an Odyssey Licor scanner. The same membrane was then re-incubated with mouse anti-β-actin (1:5000 dilution) anti-body from sigmaaldrich (MERCK) (ref. A5441) for 1 hour, then washed and reincubated with secondary goat anti-mouse antibody from Li-cor odyssey (dilution 1:5000) (ref. AB_10956588)

Murine models

CB17/Icr-Prkdc(scid)/IcrIcoCrl mice were purchased from the Jackson laboratory and housed in the animal housing of the laboratory. Tumors (or cells) were grafted subcutaneously and tumor growth was monitored thru tumor volume measurement. Treatment of mice was initiated once the tumor volume reached 100mm³. All treatments were administered intraperitoneally. Dexamethasone (Weimer Pharma GmbH) was injected at 5mg/Kg and NP137 (NetrisPharma) was injected at 10mg/Kg. Mice were sacrificed when the tumor volume reached 1600mm³. All *in vivo* experiments are subject to pre-evaluation by a specialized comity in ethics.

Flow cytometry

Cell viability was analyzed by flow cytometry after AnnexinV and PI labelling. Non-treated cells were used to calibrate annexinV and PI signals. Cells exposed under different conditions were washed with PBS 1X and labelled with AnnexinV and/or PI using Annexin-V-FLUOS staining kit from Roche (Ref.11 988 549 001). Tubes were incubated at room temperature for 15 minutes and then viability was analyzed on BD FACS LSRII using BD FACS DIVA software.

Flow cytometry was also used to detect netrin-1, UNC5H2(B) and UNC5H3(C) in fresh sample bone marrow patients. All fresh samples were lysed with (BD Pharm Lyse), and cell surface was stained with the following fluorescently conjugated antibodies : CD138-PC5 (Beckman Coulter, clone B-A38), CD19-PC7 (Beckman Coulter, clone J4.119), CD45-V500 (BD Biosciences, clone HI30), CD38-V450 (BD Biosciences, clone HB7) all at 1:100 dilution, and Anti-UNC5H3(C) MAB 1005-PE and Anti-UNC5H2(B) E231115-PE at 1:50 dilution, followed by intracellular staining for Kappa-APC (BD Biosciences, clone TB28-2), Lambda FITC (BD Biosciences, clone 1-55-2) and Anti-Netrin-1 MAB 1109-PE at 1:50 dilution. The intracellular staining was performed using IntraStain Dako kit (reference: K2311). Flow

cytometry data were acquired on the CantoII flow cytometer and BD FACSDIVA™ software was used for analyses. Gating was done by isolating the CD38+ CD138+ population first then by differentiating the CD45+ plasmocytes from the CD45- plasmocytes and finally by selecting the netrin-1+ or UNC5H2(B)+ or UNC5H3(C)+ cells.

Immunohistochemistry

Bone marrow biopsies with myeloma infiltration were retrieved from the Pathology Department of the Lyon Sud University Hospital with FFPE available material and informed patient consent. Briefly, 3µm-thick were cut from paraffin blocks, dried, de-waxed, rehydrated and slides were unmasked with ER1 Solution (Leica, Bond Epitope Retrieval Solution 1) Low pH, 100°C - 20 min for Netrin-1 (CPA2389, dilution 1:100) and finally were incubated with a commercially available detection kit HRP (Leica, Bond Polymer Refine Detection) in an automated Immunostainer (Leica BOND-MAX). UNC5H2(B) and DCC were used with the protocol provided by Abcam and Atlas antibody respectively. (see supplementary table S2 for details on antibodies).

***Ex vivo* exposure of fresh bone marrow samples to NP137**

Tumor tissue with myeloma infiltration were retrieved from the Hematology Department of the Lyon Sud University Hospital with patient informed consent. Samples were exposed for 48 hours with NP137, or vincristine used as a positive control. Cells surface was stained with the following fluorescently conjugated antibodies anti-CD138-PC5 (Beckman Coulter, clone B-A38), anti-CD45-V500 (BD Biosciences, clone HI30), anti-CD38-V450 (BD Biosciences, clone HB7) antibodies and flow cytometry data were acquired on the Canto II flow cytometer and BD FACSDIVA™ software was used for analyses.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using student t-test to analyze the significance of the *in vitro* viability tests. Mann Whitney test was used to assess the significance of the effect of the therapy on tumor growth in mice *in vivo*.

Results

Expression of netrin-1 and its receptors DCC and UNC5H2(B) in multiple myeloma

We first analyzed netrin-1, DCC and UNC5H2(B) mRNA and protein levels in 6 different human myeloma cell lines (AMO1-LP1-MM1S-OPM2-RPMI8226 and U266). As shown in Figure 1A, the expression of netrin-1 analyzed by RTqPCR was detected in half of the cell lines (number of cycles < 35) while expression of DCC and UNC5H2(B) was detected in all cell lines. Western blot analyses confirmed a detectable content of netrin-1 in LP1, MM1S, RPMI8226 and U266 (Fig. 1B). Conversely UNC5H2(B) protein was only detected in LP1 and RPMI8226 (Fig. 1C) and DCC protein expression was highly detected in LP1, MM1S, RPMI8226 and U266 similarly to what has been observed by RTqPCR. Protein content of UNC5H2(B) was observed at lower levels in AMO1 and OPM2, although the latter lines had a higher mRNA content than the other lines (Fig. 1D). These results suggested that MM1S, RPMI8226, LP1 and U266 could be used as potential models to evaluate the effect of anti-netrin-1 agents.

NP137 treatment reduces multiple myeloma cell viability *in vitro*

To assess the impact of netrin-1 targeting on the survival of multiple myeloma cells, and the effect of its combination with conventional chemotherapy, we chose two multiple myeloma cell lines, MM1S and RPMI8226, that express netrin-1 and at least one of its receptors, and we exposed them, in different conditions, to NP137 treatment combined or not with bortezomib, a proteasome inhibitor widely used in the clinic. After 72 hours, cells were harvested and their viability was analyzed by flow cytometry, after Annexin V and PI labelling. The results showed

that cells exposed to NP137 antibody alone, did not show any reduction of cell viability in both cell models; (fig 2A, 2B, 2C). The viability of MM1S cells exposed to different concentrations of bortezomib was reduced in a dose dependent manner (fig 2A). However, we found that the cytotoxicity of bortezomib on the MM1S cell line was enhanced when combined with NP137 (Fig 2A), but not in combination with a control human antibody (data not shown). These results suggest that bortezomib potentiates the cytotoxic effect of NP137 treatment on the multiple myeloma cell lines tested.

NP137 treatment reduces multiple myeloma tumor growth *in vivo*

In order to explore the effect of NP137 treatment *in vivo*, RPMI8226 cells were grafted subcutaneously in SCID mice. The mice were randomized into 4 treatment groups: control antibody, dexamethasone, NP137, NP137 combined with 5mg/kg dexamethasone all injected thrice a week intraperitoneally. Results showed at the end of the experiment, a significant decrease in tumor growth, in mice treated with NP137 in combination with dexamethasone when compared to non-treated mice ($p=0.04$) which suggests a potentiation of the cytotoxicity of NP137 by dexamethasone in this preclinical model. However, the reduction in the tumor growth observed between the NP137 treated group and the group treated with the combination of the two drugs remains non-significant at the end of the experiment($p=0.47$).

Expression of netrin-1 and its receptors DCC and UNC5H2(B) in bone marrow samples from multiple myeloma patients

In order to study the expression of netrin-1 and its receptors, DCC, UNC5H2(B) and UNC5H3(C) in multiple myeloma patients, fresh bone marrow samples from patients who consented to participate were analyzed by flow cytometry for the expression of netrin-1, DCC and UNC5H3(C). The data obtained indicated that netrin-1 expression is two times higher and UNC5H3(C) expression is two to three times higher in fresh patient samples compared to

control antibody (Fig.4A). In addition, we analyzed the expression of netrin-1, DCC and UNC5H2(B) by immunohistochemistry. The results showed that netrin-1 was identified by IHC in 6/16 samples while DCC and UNC5H2(B) were identified in all and in 13 samples, respectively. (Fig.4B)

Effect of NP137 treatment on fresh multiple myeloma patient samples *ex vivo*

We analyzed the effect of NP137 treatment on fresh patient samples. Cells were treated with 10µg/ml NP137 *ex vivo* or with 10µM vincristine as a positive control for 48 hours and the plasma cell percentage was evaluated by flow cytometry after labelling with CD38 and CD138 antibodies at 2ug/ml for 30mins. Results in figure 4C show that 3 out of 10 total patients presented lower plasma cell percentage after NP137 treatment. Similarly, plasma cell/lymphocytes ratios (figure 4D) showed lower values in samples treated with NP137 antibody compared to non-treated cells.

Discussion

In 1990, Edward Hedgecock and his colleagues discovered the implication of three proteins, encoded by *unc-5*, *unc-6* and *unc-40* genes, in the migration of mesodermal cells during the development of *C. elegans*(18). Fearon and his colleagues demonstrated the deletion of the 18q chromosome in human colorectal cancers(19). This fragment contains, among others, the DCC gene. Many studies have shown that the deletion of DCC specifically is the cause of the initiation and progression of pancreatic and colorectal cancer and not the deletion of other genes from the 18q chromosome like SMAD2 or SMAD4 (20–23). In 1998, Mehlen and his colleagues demonstrated in 1998 that DCC induces caspase-9 dependent cell death when unbound from netrin-1(24). Furthermore, Llambi et al. described in 2001 how netrin-1 acts as a survival factor when it is fixed on cells expressing its receptors(10). On the other hand, DCC

has been found to control tumor progression as a tumor suppressor gene(25,26). One of the most frequent genetic abnormalities that occurs in DCC is loss of heterozygosity(6).

Few studies have explored the expression of netrin 1 and its receptors in hematological malignancies. Broutier et al. reported in a mantle cell lymphoma model that the interference with the interaction of netrin-1 with DCC using a monoclonal antibody targeted against netrin-1 can decrease the viability of these cells (27). This monoclonal antibody recognizes a netrin-1 specific epitope located in the second laminin-type EGF-like repeat. The analysis of the crystal structure of the complex antibody/ligand shows that this region is crucial for the binding of netrin-1 to its receptor, providing a structural basis for the biological activity of NP137(28). Targeting netrin-1 in solid tumors using this antibody is currently in clinical trials (NCT02977195). The potential therapeutic impact of the disruption of the interaction between netrin-1 and its receptors *in vivo* has been explored in several types of solid tumors including pancreatic and lung cancer(29–31). To our knowledge there have been no published reports investigating the impact of netrin-targeting agents in multiple myeloma.

Our findings showed for the first time overexpression of netrin-1 and its receptors in human multiple myeloma cell lines and in human bone marrow samples from multiple myeloma patients. While the presence of netrin 1 protein was observed in only a minority of samples it is noteworthy that DCC was found by IHC in 16/16 samples and UNC5H2(B) in 13/16 samples.

In addition, we have been able to demonstrate for the first time the role of netrin-1 in the survival of multiple myeloma cell lines. Our obtained results showed a clear decrease of multiple myeloma cell viability when treated with NP137 in combination with cytotoxic agents. *In vitro*, both cell lines tested, RPMI8226 and MM1S were more sensitive to NP137 treatment when combined to bortezomib. In preclinical models, our results showed that NP137 in combination with dexamethasone reduced significantly RPMI8226 tumor growth compared to

non-treated group but not compared to NP137 in monotherapy which requires further confirmation. However, the efficacy of the combination of bortezomib with NP137 on MM1S tumor growth wasn't possible because of the resistance of MM1S to non-lethal doses of bortezomib in the proposed preclinical model.

Finally, our results of NP137 exposure of fresh human samples from multiple myeloma patients showed a decrease in both the percentage of plasma cells and the plasma cells to lymphocytes ratio in 3 out of 10 samples analyzed. While larger series will need to be analyzed, these data suggest that netrin-1 signaling is likely to be clinically relevant in a substantial portion of myeloma patients. If these data are confirmed, targeting of netrin 1 signaling using agents such as netrin 1- or netrin 1 receptor-binding agents could be considered in this disease.

References

1. Kennedy TE, Serafini T, de la Torre JoséR, Tessier-Lavigne M. Netrins are diffusible chemotropic factors for commissural axons in the embryonic spinal cord. *Cell*. 1994 Aug;78(3):425–35.
2. Leonardo ED, Hinck L, Masu M, Keino-Masu K, Ackerman SL, Tessier-Lavigne M. Vertebrate homologues of *C. elegans* UNC-5 are candidate netrin receptors. *Nature*. 1997 Apr;386(6627):833–8.
3. Palu E, Liesi P. Differential distribution of laminins in Alzheimer disease and normal human brain tissue. *J Neurosci Res*. 2002 Jul 15;69(2):243–56.
4. Rama N, Goldschneider D, Corset V, Lambert J, Pays L, Mehlen P. Amyloid Precursor Protein Regulates Netrin-1-mediated Commissural Axon Outgrowth. *J Biol Chem*. 2012 Aug 24;287(35):30014–23.
5. Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative, Sun J-H, Wang H-F, Zhu X-C, Yu W-J, Tan C-C, et al. The Impact of UNC5C Genetic Variations on Neuroimaging in Alzheimer's Disease. *Mol Neurobiol*. 2016 Dec;53(10):6759–67.
6. Fang DC, Jass JR, Wang DX. Loss of heterozygosity and loss of expression of the DCC gene in gastric cancer. *J Clin Pathol*. 1998 Aug 1;51(8):593–6.
7. Kato H, Zhou Y, Asanoma K, Kondo H, Yoshikawa Y, Watanabe K, et al. Suppressed tumorigenicity of human endometrial cancer cells by the restored expression of the DCC gene. *Br J Cancer*. 2000 Jan;82(2):459–66.
8. Keino-Masu K, Masu M, Hinck L, Leonardo ED, Chan SS-Y, Culotti JG, et al. Deleted in Colorectal Cancer (DCC) Encodes a Netrin Receptor. *Cell*. 1996 Oct 18;87(2):175–85.
9. Mehlen P, Guenebeaud C. Netrin-1 and its dependence receptors as original targets for cancer therapy. *Curr Opin Oncol*. 2010 Jan;22(1):46–54.
10. Llambi F. Netrin-1 acts as a survival factor via its receptors UNC5H and DCC. *EMBO J*. 2001 Jun 1;20(11):2715–22.
11. Koren R, Dekel Y, Sherman E, Weissman Y, Dreznik Z, Klein B, et al. The Expression of DCC Protein in Female Breast Cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2003 Jul;80(2):215–20.
12. Shibata D, Reale MA, Lavin P, Silverman M, Fearon ER, Steele G, et al. The DCC protein and prognosis in colorectal cancer. *N Engl J Med*. 1996 Dec 5;335(23):1727–32.
13. Gao X, Honn KV, Grignon D, Sakr W, Chen YQ. Frequent loss of expression and loss of heterozygosity of the putative tumor suppressor gene DCC in prostatic carcinomas. *Cancer Res*. 1993 Jun 15;53(12):2723–7.
14. Gao S, Xu W, Wan Y. [Loss of heterozygosity involving DCC gene in human colorectal cancers is correlated with the metastatic potential]. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*. 1996 Jul;18(4):250–2.

15. Tamura G. Alterations of tumor suppressor and tumor-related genes in the development and progression of gastric cancer. *World J Gastroenterol.* 2006;12(2):192.
16. Arakawa H. Netrin-1 and its receptors in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer.* 2004 Dec;4(12):978–87.
17. Forcet C, Ye X, Granger L, Corset V, Shin H, Bredesen DE, et al. The dependence receptor DCC (deleted in colorectal cancer) defines an alternative mechanism for caspase activation. *Proc Natl Acad Sci.* 2001 Mar 13;98(6):3416–21.
18. Hedgecock EM, Culotti JG, Hall DH. The *unc-5*, *unc-6*, and *unc-40* genes guide circumferential migrations of pioneer axons and mesodermal cells on the epidermis in *C. elegans*. *Neuron.* 1990 Jan 1;4(1):61–85.
19. Fearon ER, Cho KR, Nigro JM, Kern SE, Simons JW, Ruppert JM, et al. Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers. *Science.* 1990 Jan 5;247(4938):49–56.
20. Hilgers W, Song JJ, Haye M, Hruban RR, Kern SE, Fearon ER. Homozygous deletions inactivate DCC, but not MADH4/DPC4/SMAD4, in a subset of pancreatic and biliary cancers. *Genes Chromosomes Cancer.* 2000 Apr;27(4):353–7.
21. Howe JR, Roth S, Ringold JC, Summers RW, Järvinen HJ, Sistonen P, et al. Mutations in the SMAD4/DPC4 gene in juvenile polyposis. *Science.* 1998 May 15;280(5366):1086–8.
22. Ogawa R, Yamamoto T, Hirai H, Hanada K, Kiyasu Y, Nishikawa G, et al. Loss of SMAD4 Promotes Colorectal Cancer Progression by Recruiting Tumor-Associated Neutrophils via the CXCL1/8-CXCR2 Axis. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2019 01;25(9):2887–99.
23. Salovaara R, Roth S, Loukola A, Launonen V, Sistonen P, Avizienyte E, et al. Frequent loss of SMAD4/DPC4 protein in colorectal cancers. *Gut.* 2002 Jul;51(1):56–9.
24. Mehlen P, Rabizadeh S, Snipas SJ, Assa-Munt N, Salvesen GS, Bredesen DE. The DCC gene product induces apoptosis by a mechanism requiring receptor proteolysis. *Nature.* 1998 Oct 22;395(6704):801–4.
25. Duman-Scheel M. Deleted in Colorectal Cancer (DCC) pathfinding: axon guidance gene finally turned tumor suppressor. *Curr Drug Targets.* 2012 Oct;13(11):1445–53.
26. Grady WM. Making the case for DCC and UNC5C as tumor-suppressor genes in the colon. *Gastroenterology.* 2007 Dec;133(6):2045–9.
27. Broutier L, Creveaux M, Vial J, Tortereau A, Delcros J-G, Chazot G, et al. Targeting netrin-1/DCC interaction in diffuse large B-cell and mantle cell lymphomas. *EMBO Mol Med.* 2016 Feb 1;8(2):96–104.
28. Abstract 2921: Preclinical characteristics of NP137, a first-in-class monoclonal antibody directed against netrin-1 and inducing dependence receptors-mediated cell death | Cancer Research [Internet]. [cited 2020 Mar 1]. Available from: https://cancerres.aacrjournals.org/content/75/15_Supplement/2921

29. Delloye-Bourgeois C, Brambilla E, Coissieux M-M, Guenebeaud C, Pedeux R, Firlej V, et al. Interference With Netrin-1 and Tumor Cell Death in Non-Small Cell Lung Cancer. *JNCI J Natl Cancer Inst.* 2009 Feb;101(4):237–47.
30. Delloye-Bourgeois C, Fitamant J, Paradisi A, Cappellen D, Douc-Rasy S, Raquin M-A, et al. Netrin-1 acts as a survival factor for aggressive neuroblastoma. *J Exp Med.* 2009 Apr 13;206(4):833–47.
31. Paradisi A, Creveaux M, Gibert B, Devailly G, Redoulez E, Neves D, et al. Combining chemotherapeutic agents and netrin-1 interference potentiates cancer cell death. *EMBO Mol Med.* 2013 Dec;5(12):1821–34.

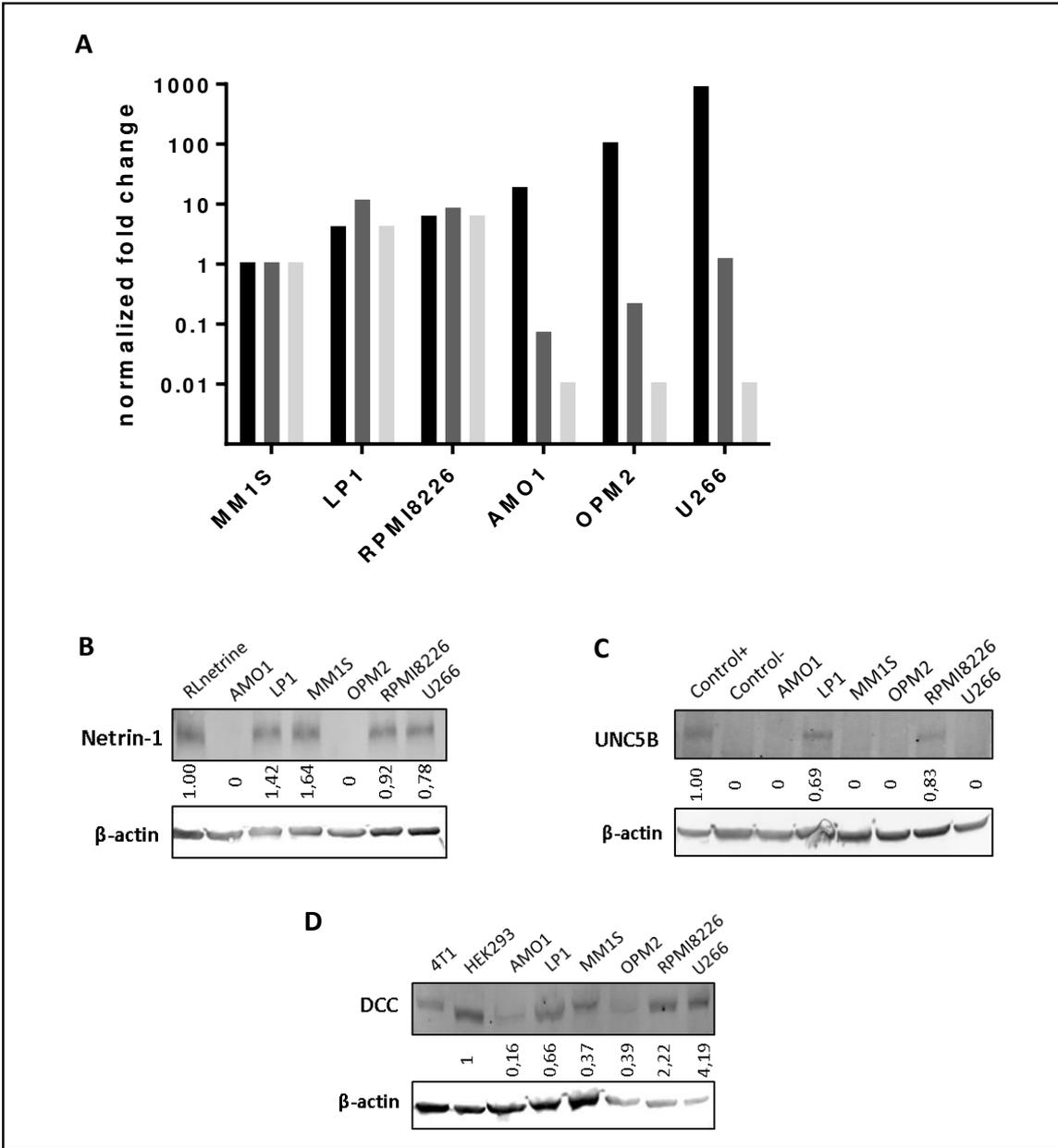


Figure 1: Expression of netrin-1 and its receptors in multiple myeloma cell lines. (A) netrin-1, UNC5H2(B) and DCC expression by RT-qPCR in six models of multiple myeloma (MM1S is used as a reference line for the expression of the genes). Netrin-1 expression in AMO-1, OPM-2 and U266 is not detectable thus represented by fold change equal to 0.01. (B) Expression of netrin-1 by western blot. (C) Expression of UNC5H2(B) by western blot. (D) Expression of DCC by western blot.

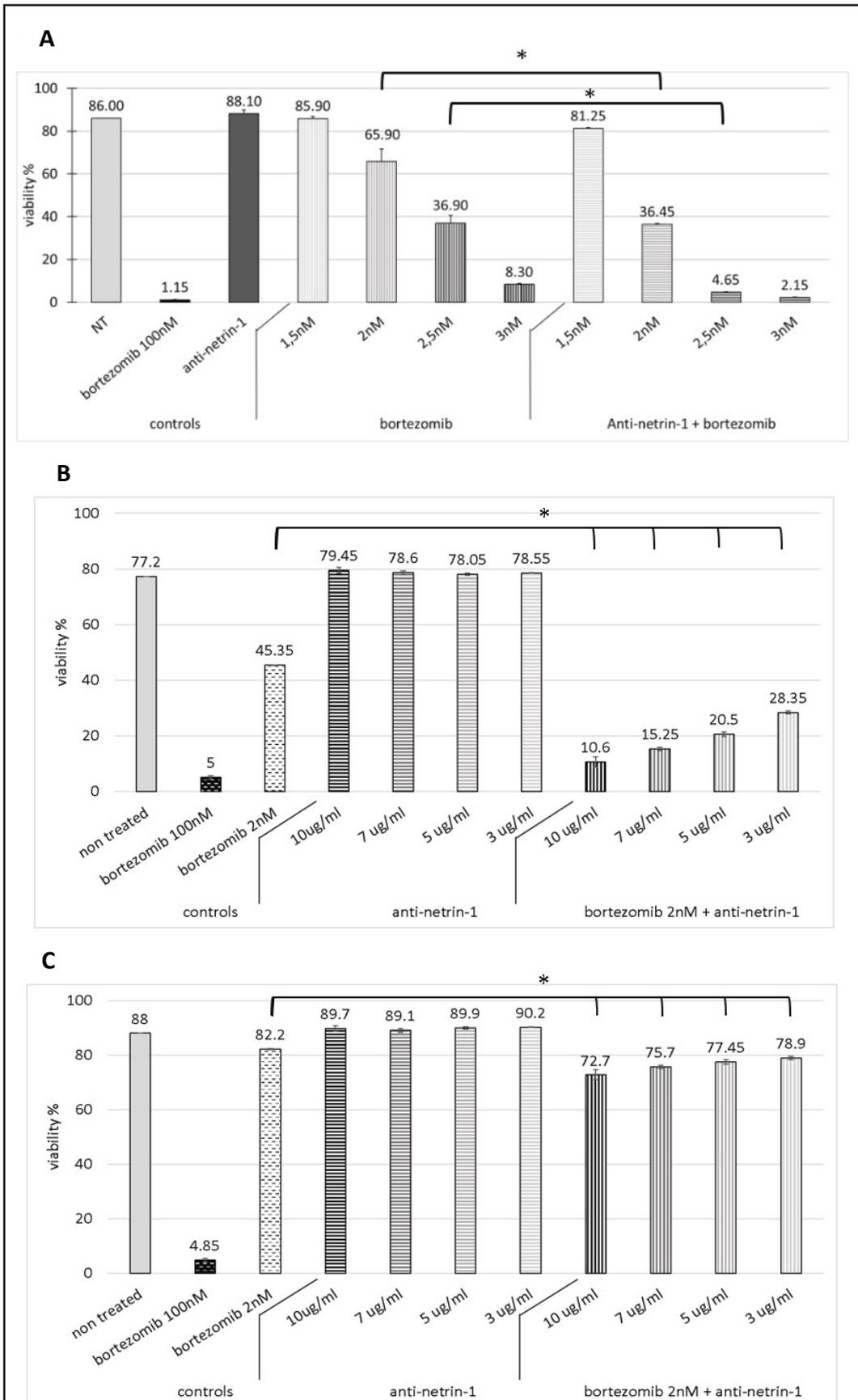


Figure 2: Evaluation of the viability of multiple myeloma cell lines after NP137 treatment. (A and B) MM1S and (C) RPMI8226. NP137 treatment in combination with bortezomib. Cells were harvested and viability was analyzed by flow cytometry after annexin V/pi labeling. *p<0.05

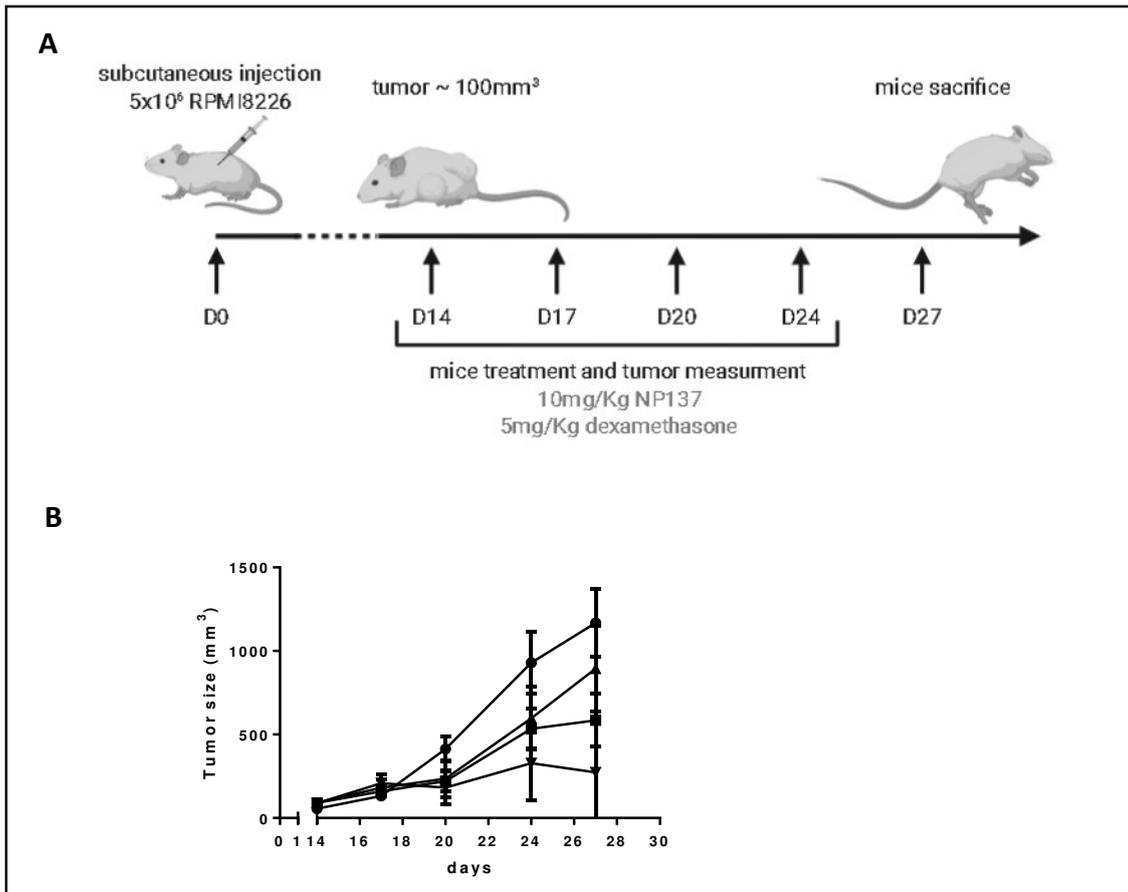


Figure 3: Effect of NP137 treatment on ectopically grafted, multiple myeloma tumor growth, in SCID mice. (A) Representation of grafting of multiple myeloma RPMI8226 cell line in mice and of the treatment protocol. (B) Analysis of the tumor growth after NP137 and/or dexamethasone treatment. *p<0.05

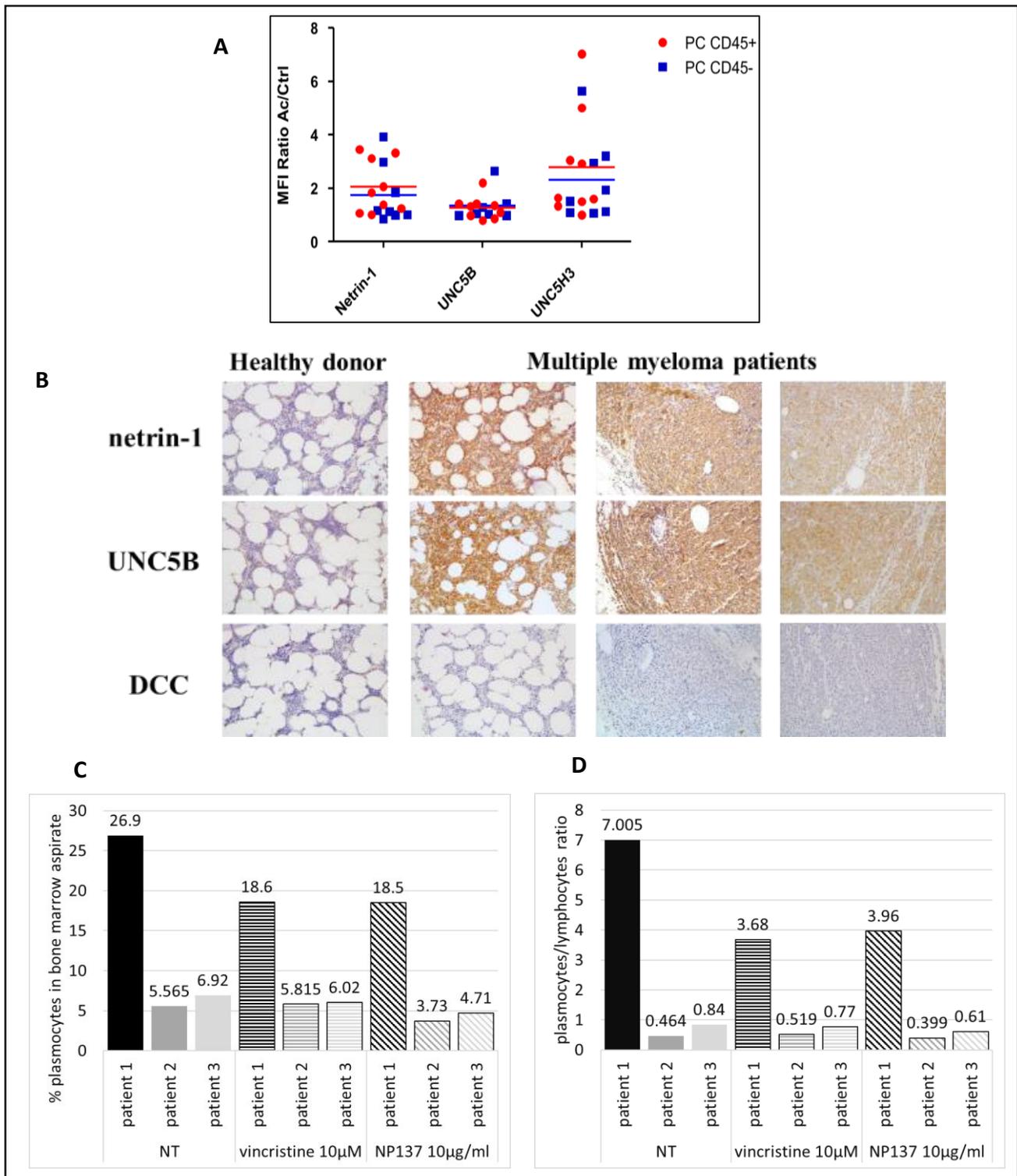


Figure 4: Expression of netrin-1 and its receptors DCC, UNC5H2(B), UNC5H3(C), and the effect of NP137 treatment in multiple myeloma patients' bone marrow aspirates. (A) Analysis of the expression by flow cytometry. Expression is compared to control antibody. (B) Analysis of the expression by immunohistochemistry. Expression is compared to healthy individuals. (C) Evaluation of plasmocytes percentage in fresh bone marrow aspirates obtained from multiple myeloma patients and treated with NP137 treatment. (D) Evaluation of the plasmocytes/lymphocytes ratio in fresh bone marrow aspirates obtained from multiple myeloma patients and treated with NP137 treatment.

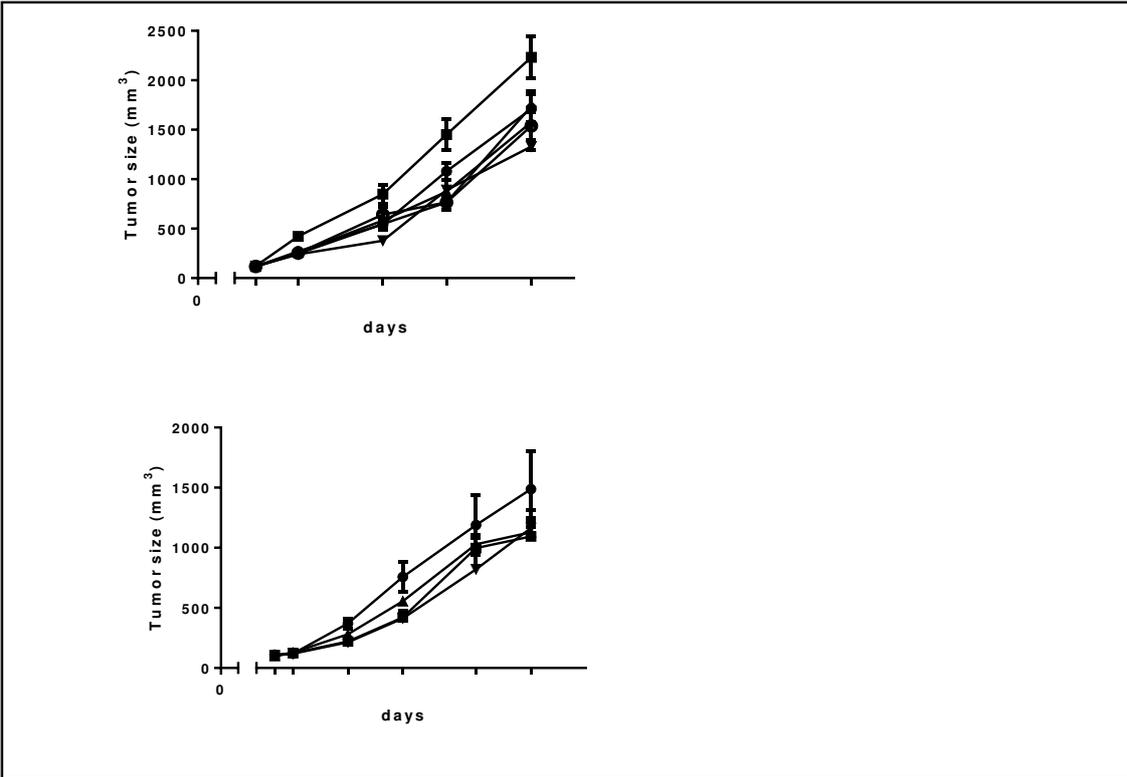


Figure S1: Effect of NP137 treatment in combination with bortezomib on ectopically grafted, MM1S multiple myeloma tumor growth mice.

Chapitre III : Évaluation de la valeur pronostique et de l'effet du ciblage de EDAA1/EDAR dans les Leucémies Aigües Myéloïdes.

La leucémie aiguë myéloïde est un cancer des cellules progéniteurs des lignées myéloïdes des globules blancs du sang, caractérisée par la multiplication très rapide des cellules cancéreuses. Ces dernières présentent dans la plupart des cas une variété des mutations qui causent des résistances aux différentes chimiothérapies. Cette résistance aux chimiothérapies conventionnelles basées dans la plupart des cas sur les molécules cytotoxiques non ciblées comme les anthracyclines ou l'aracytine est une cause rationnelle et essentielle pour le développement de nouvelles thérapies anti-cancer ciblées dont certaines ont commencé à émerger tel que les inhibiteurs de FLT3 de première et de deuxième générations qui peuvent résoudre le problème pour ce type d'hémopathies.

Le rôle des récepteurs de mort de type TNF (FAS, TNFR, DR3, DR4, DR5 et leurs ligands) dans les cancers solides a été l'objet d'un grand nombre d'études portant sur le développement de plusieurs thérapies anti-cancéreuses. Dans les hémopathies, ces récepteurs sont également explorés et les études récentes s'intéressent à leur signalisation pour développer des thérapies ciblées. Le récepteur de l'ectodysplasine EDAR est un récepteur de type TNF qui a montré récemment un potentiel d'être un récepteur à dépendance. Jonathan Vial et ses collègues ont récemment démontré qu'EDAR est capable d'induire la mortalité dans un modèle cellulaire in vitro à la fois quand il est surexprimé ou en absence de son ligand l'ectodysplasine A1. Cette induction de mort est strictement liée à une protéine adaptatrice appelée EDARADD spécifique à EDAR à l'inverse de FADD qui est commun aux autres récepteurs de mort. La signalisation d'EDAR est aussi fortement impactée par deux protéines : la première étant la caspase-8 qui est responsable de l'apoptose indépendante de la mitochondrie comme dans toutes les signalisations des récepteurs de mort. La deuxième est la protéine c-FLIP régulatrice de l'activité caspase-8.

Dans ce chapitre nous explorons le rôle d'EDAR en tant que récepteur à dépendance dans les leucémies aigues myéloïdes ainsi que la relation de l'expression de c-FLIP et d'EDARADD dans l'induction de l'apoptose par EDAR à travers la caspase-8 dans des modèles cellulaires de LAM. De ce fait, nous évaluerons l'effet d'anticorps antagonistes et agonistes dirigés contre EdaA1 sur la viabilité des modèles cellulaires de leucémies aigues myéloïdes ainsi que l'effet de l'anticorps antagoniste sur la croissance tumorale dans un modèle préclinique et ceci en combinaison avec le lupéol, un inhibiteur de c-FLIP. En parallèle, nous évaluerons la valeur pronostique du couple EDAR/EdaA1 dans une cohorte d'environ deux-cent-vingt patients atteints de LAM.

Nos résultats montrent que l'ectodysplasine et son récepteur EDAR sont exprimés dans les lignées cellulaires testées. En revanche, l'anticorps antagoniste anti-EdaA1, le NP604 fourni par NETRIS Pharma, ne semble pas avoir un effet intrinsèque sur viabilité cellulaire en monothérapie. En revanche lorsqu'il est combiné au lupéol, cet anticorps diminue significativement la viabilité cellulaire des lignées LAM. Dans ce contexte, nos résultats préliminaires suggèrent que le lupéol induit la mortalité cellulaire en inhibant c-FLIP mais également en favorisant le clivage de la caspase-8. Cependant, cette combinaison des deux traitements n'avait pas le même effet sur la croissance tumorale des xénogreffes de LAM. In vivo le traitement combiné de lupéol et du NP604 ne réduisait pas significativement la croissance tumorale. Finalement, les résultats de l'évaluation de l'expression de EdaA1 et d'EDAR dans la cohorte de patients de LAM montraient une surexpression de ce couple dans la majorité des cas mais d'autres études sont nécessaires pour vérifier la corrélation de l'expression au pronostic des patients.

Exploring the role of the ectodysplasin receptor in acute myeloid leukemia.

FAHED David¹, CHETTAB AbdelKamel¹, BEAUMEL Sabine¹, MATHE Doriane²,
DUMONTET Charles^{1,2,3}.

¹Anticancer Antibodies Team, CRCL, INSERM U1052, CNRS UMR5286, CLB, UCBL,
Lyon, France

²Antineo, Lyon, France

³Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

Abstract

Ectodysplasin receptor (EDAR) is a key receptor that plays a crucial role during development, precisely during the formation of the ectoderm. However, this receptor belongs to the family of the TNF receptors. These receptors are well studied in cancers and they are better known for their ability to induce caspase-8 dependent apoptosis via their intracellular death domain when they are bound to their ligand. Their signaling pathway implicates caspase-8 regulatory proteins such as c-FLIP which regulates negatively the apoptosis with its caspase-8-like domain. Conversely, EDAR seems to act as a dependence receptor and seems to be capable of inducing cell death only in the absence of its ligand.

Here, we analyzed the expression of ectodysplasin A1 (EdaA1) and ectodysplasin receptor (EDAR) as well as the expression of c-FLIP and EDARADD, the associated protein to the intracellular domain of EDAR, in human AML cell lines to assess the potential anti-AML activity of a novel anti-EdaA1 treatment (NP604). In addition, we have studied the impact of lupeol, a c-FLIP inhibitor on the expression of c-FLIP and the cleavage of caspase-8. Finally, we have analyzed the expression of EdaA1 and EDAR in a cohort of AML patients to determine whether EDA or EDAR expression levels could be correlated with patient survival.

Our results showed that AML cell lines express both the EdaA1 ligand and its receptor EDAR. The exposure of AML cell lines to NP604 in vitro did not induce a significant decrease in cell viability but its combination with lupeol showed a significant impact on the viability of the cells. This combination of treatments did not significantly impact on tumor growth in SCID mice with established AML tumors in comparison to controls. However, the treatment of AML cell lines with lupeol seems to increase the cleavage of pro-caspase-8 in these malignancies. Screening of patient samples found expression of EdaA1 and EDAR in a majority of AML patient samples, with a possible correlation between EdaA1 expression and overall survival, but not with EDAR levels.

These results suggest that ectodysplasin signaling could constitute a novel therapeutic target in acute myeloid leukemia.

Introduction

EDAR (ectodysplasin receptor) is a type I receptor belonging to the family of TNF receptor. In humans, it is encoded by the EDAR gene. It belongs to the tumor necrosis factor receptor TNFR superfamily. It binds with high specificity to its ligand, EDaA1, that is also a member of the TNF family, and one of the two isoforms encoded by the EDA gene, thereby inducing a signaling pathway mainly through the nuclear factor-kappaB (NF- κ B) and c-jun N-terminal [1]. The Eda-A1 / EDAR pathway is active to ensure normal induction, morphogenesis and maintenance of ectodermal organs, such as teeth, hair, sweat glands and several other glands [2]. Consequently, mutations and / or deficiencies in EDaA1, EDAR or other molecules in this signaling pathway cause anhidrotic ectodermal dysplasia HED characterized by a defective development of structures derived from the skin and several exocrine glands such as the sweat glands probably due to an altered NF- κ B response [3].

While EDAR is generally considered to be an NF- κ B signaling receptor, the presence of a death domain in its intracellular structure has led several studies to explore the capacity of EDAR to trigger cell death [4]. Recently, EDAR has been shown to lead to the induction of apoptosis in melanocytic tumors, thereby limiting the progression of melanoma [1]. The results obtained suggest that this receptor plays the role of a tumor suppressor in this type of cancer, rather than a death receptor. Interestingly, the results showed that EDAR cannot be labeled as a "classic" death receptor. In fact, unlike the responses of death receptors during ligand binding, EDAR-induced apoptosis is inhibited in the presence of Eda-A1, in a dose-dependent manner [1]. Instead of inducing the interaction between EDAR and caspase-8, Eda-A1 reverses it, thus leading to the activation of the "positive" signaling pathway [1]. Furthermore, the induction of apoptosis via EDAR is not directly linked to the classical death domain of TNFRs; FADD, but rather involves a domain specific to this receptor; EDARADD (EDAR Associated Death

Domain) [1]. Thus, it has been attested that during the deactivation of EDARADD, the apoptosis signaling pathway seemed to be modified [1].

EDARADD is indeed structurally different from the conventional associated proteins of TNF receptors but has similar physiological activity. It has a death domain (DD) that interacts with the death domain DD of EDAR, and another undefined domain that is suggested to recruit TRAFs for NF- κ B signaling.

Here, we explore the role of EDAR as a dependence receptor in acute myeloid leukemia as well as the relationship of the expression of c-FLIP an anti-apoptotic protein that seems to interact with receptors from the TNF family and EDARADD to the induction of EdaA1/EDAR dependent apoptosis through caspase-8 in cellular models of LAM. Therefore, we evaluated the effect of a new anti-EdaA1 therapy on the viability of cellular models of acute myeloid leukemia as well as its effect on tumor growth in a preclinical model, all of this in combination with lupeol, a c-FLIP inhibitor. In parallel, we assessed the prognostic value of the EDAR / EdaA1 couple in a cohort of approximately two hundred and twenty AML patients.

Materials and methods

1. Cell lines

Human acute myeloid leukemia cell lines (HEL, HL60 and Kasumi-1) were obtained from ATCC and were cultured in RPMI-1640 (Sigma Aldrich) supplemented with 10% FBS, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin and 100 μ g/ml streptomycin (all from Sigma Aldrich).

Capan-1 (human pancreatic cancer), Hela (human cervical cancer), MCF7 (human breast cancer), HepG2 (human hepatocellular carcinoma) and HT29 (human colorectal adenocarcinoma) cell lines were also obtained from ATCC and were cultured in DMEM high glucose (4.5g/l) medium (Sigma Aldrich) supplemented with 10% FBS, 2 mM L-glutamine,

100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin. All cells were maintained in 5% CO₂ at 37°C in a humidified atmosphere.

2. Study of the gene expression of EDAR, EdaA1, EDARADD and c-FLIP by RTqPCR

2.1. Materials

Qiagen RNA extraction kit (ref: Cat No./ID: 74104). Reverse transcription kit containing: 1 tube containing 1ml of 5X Buffer (250 mM Tris-HCl (pH 8.3), 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂); 1 tube containing 500 µl of DTT at 0.1 M and 1 tube containing 200 µl of M-MLV Reverse Transcriptase at 200U/µl (Invitrogen Thermofisher reference of the kit: 28025). dNTP mix (10 mM each) (Invitrogen Thermofisher ref.: 18427013), Random Primers (3 µg/µl) (Invitrogen Thermofisher ref. 48190011). DEPC water. SybrGreen ® Master kit (Eurogentec: UF-NSCT-B0201). Thermofisher 96well PCR plates (ref. AB0900W). Thermofisher PCR Plate, 384-well, standard, white (ref. AB1384W). Sequences of EdaA1-, EDAR- EDARADD- and 28S ribosome-specific primers, and sequences of c-FLIP-L, c-FLIP-R, c-FLIP-S are given in Table 1 (The 18S kit is used to normalize c-FLIP expression because the protocol uses probes. While 28S primers are used to normalize gene expression assessed using the SYBRgreen protocol). These primers are available upon request. Eukaryotic 18S rRNA Endogenous Control (VICTM/TAMRATM probe, primer limited) (Applied Biosystems, Thermofisher, catalog number: 4310893E). Roche kit LightCycler FastStart DNA Master HybProbe (ref 12 239 272 001).

2.2. Methods

2.2.1. RNA extraction

1.

4.

5.

control sample (cell line) and finally apply the rule of $2^{-\Delta \Delta C_T}$ to calculate the normalized fold difference.

Note: threshold cycle (Ct) for 28S (or 18S) housekeeping gene should be greater than 6 and difference between threshold cycles for 28S (or 18S) of different samples should be less than 2 cycles. In addition, the threshold cycle (Ct) for genes of interest should not exceed 35.

SybrGreen ® Master kit				FastStart DNA Master HybProbe		
qPCR mix						
2.9 µl master mix, 0.4 µl (final concentration 0.1-0.5 µM) of each primer (forward and reverse, see below), 1.3 µl of water.				3.33 µl of FastStart DNA Master HybProbe, 0.37 µl of probe + primers (see below) (all at 0.1-0.5 µM) and 1.3 µl H ₂ O		
Primers and/or probes						
	Forward primer	Reverse primer		Forward primer	Reverse primer	Probe
28S	GAAAGATGGTGAAGTATGCC	TTACCAAAGTAGCCCACTA	c-FLIP _L	GCTCACCATCCC TGTACCTG	CAGGAGTGGGCG TTTTCTT	Universal probelibrary #14 (Roche)
EdaA1	AGTCAGGTAGAAGTATACTAC	GGCGATCTTCTGCCGGGCCTT	c-FLIP _S	TCTCCAAGCAGC AATCCA	TCACATGGAACA ATTTCCAAGAATT TT	5'-6(FAM)- TTCAGGATGATAACACCCT ATGCCATTGTC- (TAMRA)-3'
EDAR	AGGTGTGCCAGGGACCTAT	TGGAAACTCAGTCCTTGCCG	c-FLIP _R	CAAGCAGCAATC CAAAGAGTCT	TCATGCTGGGATT CCATATGTTT	5'-6(FAM)- CCAGACTCACCTGAAGTT ATTTGAAGGATCCT- (TAMRA)-3'
EDARADD	GAACAGTCAGAGGACGGTGG	CACCGAAACAAGCTACCCCT	18S	Eukaryotic 18S rRNA Endogenous Control (Applied Biosystems, Thermofisher, catalog number: 4310893E)		

qPCR Program

3. Analyse caspase-8 and c-FLIP protein expression by western blots

3.1. Materials

PBS 1X (Thermofisher ref.10010023). Trypsin-EDTA (0.25%), phenol red (Thermofisher Catalog number: 25200056). Lysis buffer A (20 mM Tris-HCl pH 6.8, 1 mM MgCl₂, 2 mM EGTA, 0.5 % NP40). Protease inhibitor cocktail (10 µg/ml STI (Soybean trypsin inhibitor), 1 µg/ml leupeptin, 1 µg/ml aprotinin, 300 µg/ml benzamidine, 75 µg/ml PMSF (phenyl-methyl-sulfonyl-fluoride), 10 µg/ml TPCK (tosyl-phenyl-alanyl-chlormethyl-ketone)). BSA (bovine serum albumin) (Thermofisher ref.23209). Coomassie Blue (Pierce ref. 23200). TGS 10x (biorad ref.1610732). Biorad mini-Protean TGX stain-Free Precast Gels 10% (ref. 4568033). 4x Laemmli Sample Buffer (biorad ref.1610747). Thermo Scientific™ PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 10 to 250 kDa (ref. PI26620). PVDF membrane (Invitrogen iBlot transfer stack ref. IB24001). Mouse anti-human caspase-8 (enzo life science ADI-AAM-118-E). Rabbit anti-human c-FLIP (Abcam ref. ab8421). Mouse anti-human B-actin (thermofisher ref. A5441). Anti-mouse secondary antibody (IRDye® 680RD Goat anti-Mouse IgG Secondary Antibody ref. 926-68070). Anti-rabbit secondary antibody (IRDye® 800CW Goat anti-Rabbit IgG Secondary Antibody ref. 926-32211). Odyssey blocking buffer (prepared in PBS) (licor ref.927-40000). Tween 20 (Sigma ref.11332465001). Lupeol (Sigma Aldrich ≥ 95% purity ref. L5632. Stock solution 15 mmol/L diluted in DMSO. The final concentration of DMSO was maximum at 0.5% in all treatment protocols).

3.2. Methods.

3.2.1. Lupeol treatment.

- 1.

1.

1.

4.

At the onset of apoptosis, changes occur on the surface of cells. One of these membrane alterations is the translocation of phosphatidylserine (PS) from the inner leaflet of the membrane to the outer leaflet, exposing PS on the cell surface.

Annexin-V is a Ca^{2+} dependent phosphatidylserine-binding protein, making annexin labelling an excellent assay to detect apoptosis.

Propidium iodide is a DNA marker that can stain necrotic, but not intact cells.

4.1.1. Materials

NP604 (humanized Anti-Ectodysplasin obtained from NetrisPharma Ci, at 6.57 mg/ml). NP001 (control antibody IgG isotype obtained from NetrisPharma Ci at 10 mg/ml). Etoposide (Sigma No. E1383). Annexin-V-FLUOS Staining Kit (Roche Cat. No. 11 988 549 001). Lupeol (Sigma Aldrich $\geq 95\%$ purity ref. L5632. Stock solution at 15 mmol/L diluted in DMSO. The final concentration of DMSO was maximum at 0.5% in all treatment protocols). HEPES (Thermo scientific ref.15630080). PBS 1X (Thermo scientific ref. 10010023).

For 1 reaction: 100 μ l of HEPES buffer + 1 μ l annexin + 0.2 μ l PI stock solution at 0.5 mg/ml (prepared) or 2 μ L of the PI solution supplied with the Roche kit

6.

The MTT assay is a colorimetric assay for assessing cell metabolic activity. NAD(P)H-dependent cellular oxidoreductase enzymes may, under defined conditions, reflect the number of metabolically active cells present. These enzymes are capable of reducing the tetrazolium dye MTT 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide to its insoluble formazan, which has a purple color.

5.1. Materials

Lupeol (Sigma Aldrich $\geq 95\%$ purity ref. L5632. Stock solution 15 mmol/L diluted in DMSO). Nunc™ 96-Well Polystyrene Round Bottom Microwell Plates (Thermofisher ref. 268200). Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT, SigmaAldrich Ref: M2128). Isopropanol (SigmaAldrich ref. I9516-1L). HCl (SigmaAldrich ref. H1758).

5.2. Methods

5.2.1. Inoculation of cells in the 96-well plate.

Day 1: Monday, Tuesday or Friday.

1.

6.

6.1. Materials

CB17/Icr-Prkdc(scid)/IcrIcoCrl 4-week old female mice were purchased from the Jackson laboratory and housed in the animal housing of the laboratory. Lupeol (Sigma Aldrich $\geq 95\%$ purity ref. L5632). Sunflower oil (SigmaAldrich re. S5007). Humanized anti-human-EdaA1 (NetrisPharma). PBS 1X (Thermofisher ref.10010023).

Note: The project is carried out after the authorization of the ethics committee taking into account the rules of 3R and the suffering of the animal. The protocol was reviewed and approved by the CECCAPP Animal Ethics Committee of Lyon.

6.2. Methods

- 1.

8.

expression of c-FLIP in AML cell lines, to investigate whether it causes the resistance towards NP604 treatment by blocking caspase-8 after obtaining preliminary results showing no intrinsic effect of NP604 on cell viability (data not shown). Results of the analysis of EDARADD gene expression obtained by RTqPCR illustrated in figure 2A show that EDARADD gene expression is detected in the three AML cell lines analyzed. Equally, the analysis of the expression of the 3 mRNA isoforms of c-FLIP(L, S and R) shows moderate expression of c-FLIP_L and c-FLIP_S isoforms in all three cell lines and relatively high expression of c-FLIP_R isoform when compared to HT29 as positive control cell lines (figure 2B). In parallel, c-FLIP protein expression has been detected in all AML cell lines screened by western blot (figure 2C).

NP604 treatment enhances the effect of lupeol on cell mortality in vitro.

In order to study the cytotoxic effect of lupeol on AML cell lines, we have treated AML cell lines with an increased concentration of lupeol from 1 to 100µM and after 72hours we analyzed the cell viability by MTT assay. The results of cell viability analysis after lupeol treatment showed cytotoxicity on AML cell lines with IC₅₀ value at 20 µM for HEL and Kasumi-1 cells, but higher IC₅₀ value at 80 µM for HL60 cell line (figure 3A). After determining the IC₅₀ of lupeol relative to each cell line we wanted to evaluate the effect of ectodysplasin blockage by an anti-EdaA1 humanized antibody in combination with a c-FLIP inhibitor on cell viability. Therefore, we treated different AML cell lines with NP604 with lupeol, a potential c-FLIP inhibitor described in literature. The results of cell viability analysis by flow cytometry after annexin V / PI labelling illustrated in the figure 3B showed that the combination of lupeol with NP604 reduced significantly the viability of HEL, HL60 and Kasumi-1 cell lines compared to single agent exposure using lupeol or NP604 alone. Together these results suggest that c-FLIP inhibition might be crucial for EDAR to induce apoptosis.

Lupeol modulates c-FLIP and procaspase-8 expression in AML cell lines.

To further investigate the signaling pathway by which lupeol is inducing apoptosis in our cell models, we evaluated its effect on the protein expression and cleavage of c-FLIP and caspase-8 by western blot. Results of western blot scans showed caspase-8 cleavage in all AML cell lines treated with lupeol for 24 hours (figure 4A and 4B). Also, results for c-FLIP screening showed decrease in c-FLIP_L cleavage in HEL cell line (figure 4C). On the other hand, c-FLIP_S but not c-FLIP_L was cleaved in HL60 and in Kasumi-1 (figure 4D). These results suggest that lupeol induces apoptosis probably by activating procaspase-8 via inhibition of c-FLIP.

Expression of EdaA1 and EDAR in AML patients

To further understand the role of these proteins in AML malignancies, we analyzed the expression of EDAA1 and EDAR in a set of 220 patient samples from Hospices Civils de Lyon showing that these genes are expressed in 90% of AML patients. Our results showed that both EDAA1 and EDAR are expressed in a large fraction of the samples analyzed by RTqPCR (figure 5A and 5B). In fact, 90.95% of patients with EDAR expression simultaneously express the EDAA1 ligand and 77.62% of patients who have an expression of EDAR 100 times greater than healthy individuals who participated in the cohort, have at the same time an expression of EDAA1 100 times greater than healthy individuals. Additionally, we wanted to correlate the results obtained to the prognosis of AML patients. For that we examined patients' follow-ups to determine their overall survival using Kaplan Meier estimator method. Results illustrated in figure 5C, 5D, 5E, 5F showed that the level of expression of EdaA1 appears to be correlated with survival without relapse and the overall survival of AML patients. A low level of expression being an unfavorable factor. EDAR on the other hand was not correlated with survival.

Discussion

Ectodysplasin receptor, being a TNF receptor, shares many characteristics with death receptors that belong to this family. Among these characteristics, we can find mainly the presence of a death domain associated protein. In the case of EDAR, this associated protein known as EDARADD has been proven by recent studies to be structurally different from others, but seems to have similar functions by activating mitochondria independent caspase-8 apoptosis as a recent study showed. Since it has been shown that EDAR leads to the induction of apoptosis in melanoma [1], studies suggested that this receptor plays the role of a tumor suppressor in cancer, rather than a death receptor. On the other hand, the induced apoptosis due to the overexpression of EDAR has been reversed when the cells were treated with recombinant EdaA1[1]. However, the mechanism by which EDAR triggers cell death are still very little known mainly in hematological malignancies. In view of this, c-FLIP, a major apoptosis regulatory protein frequently overexpressed in solid and hematological cancers, in which its strong expression is often correlated a poor prognosis [5] and its downregulation is part of an effective drug-mediated cell death [6], seems to have a role, similar to what was observed in death receptors, in binding to the associated protein to the death domain of EDAR, EDARADD, and therefore inhibits the pathway of apoptosis via caspases. c-FLIP has been shown to play a role of a key protein in chemo-resistant cancers therefore studies aiming to target death receptors focus on the co-inhibition of c-FLIP along with the targeting of the receptor.

In this study, our objective was to determine whether ectodysplasin A1 and its receptor EDAR play a significant role in acute myeloid leukemia, which is a high refractory hematological malignancy to conventional chemotherapies. In addition, we wanted to evaluate the prognostic effect of this couple in such malignancies.

Our findings were the first of their kind in the field of hematology, reporting for the first time the overexpression of EdaA1 and EDAR in AML cell lines. Moreover, we have been able to

report that AML cell lines express equally all three isoforms of c-FLIP along with EDARADD that plays the role of a key in the lock to relate c-FLIP mediated resistance to EDAR signaling, which points the study more towards co-targeting of both our potential dependence receptor and a key resistance protein. Interestingly our results suggest that targeting EDAA1 alone with a monoclonal antibody is not sufficient to trigger significant cell apoptosis. However, when we combined NP604 treatment to lupeol, a suggested c-FLIP inhibitor, EDAR was able to induce apoptosis more efficiently. These observations verify at the same time our hypothesis on the role of EDAR as a dependence receptor and fit well with what has been described in the literature concerning intracellular signaling of TNF death receptors. However preliminary experiments performed in mice did not show the same effect of this combination on tumor growth in vivo. (supplementary figure 1)

Our results suggest that lupeol acts on both the cleavage of c-FLIP and the activation of caspase-8 suggesting that the inhibition of c-FLIP helps overcoming the resistance against EDAR targeted therapies. That being so, further studies are required to demonstrate the physical interaction of caspase-8 with EDARADD.

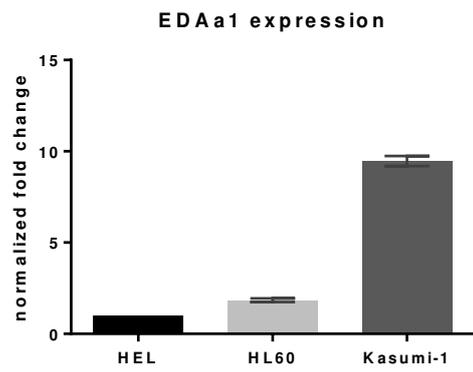
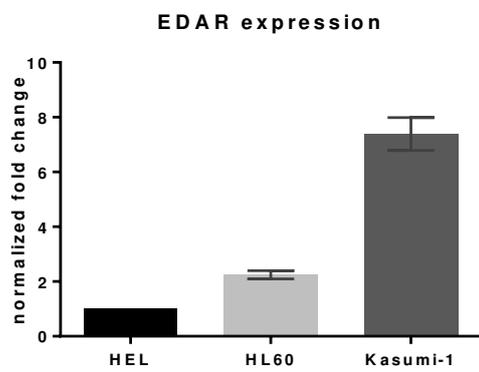
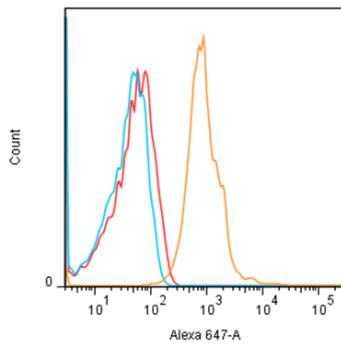
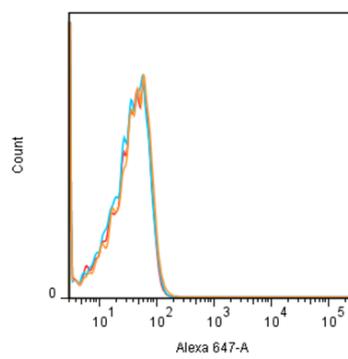
Concerning the clinical role of these proteins, few studies have been done on cancer patients but only some unpublished data from TCGA show that EDAR and EdaA1 are overexpressed in a large fraction of AML patients. Our analysis was in accordance with what had been observed, showing overexpression of this couple in AML patient samples. Nonetheless, the correlation of the expression of this couple to the prognosis of AML patients still needs further confirmation.

In summary, our results suggest that EdaA1 and EDAR are overexpressed in AML and that targeting EDAA1 within a combined therapy including a c-FLIP inhibitor constitutes a promising therapeutic option in acute myeloid leukemia. If future works prove interactions

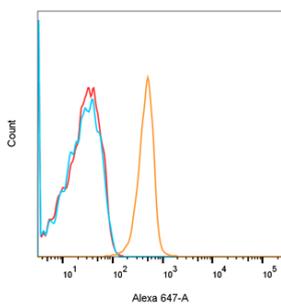
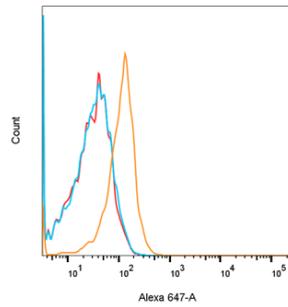
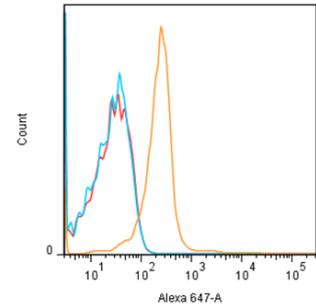
between the signaling pathway of EDAR and caspase-8 then dual targeting will be required for therapeutic purposes in this disease.

References

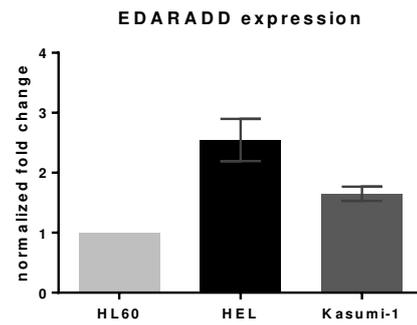
- [1] J. Vial *et al.*, “The Ectodysplasin receptor EDAR acts as a tumor suppressor in melanoma by conditionally inducing cell death,” *Cell Death Differ.*, vol. 26, no. 3, pp. 443–454, Mar. 2019, doi: 10.1038/s41418-018-0128-1.
- [2] J. Kere *et al.*, “X-linked anhidrotic (hypohidrotic) ectodermal dysplasia is caused by mutation in a novel transmembrane protein,” *Nat. Genet.*, vol. 13, no. 4, pp. 409–416, Aug. 1996, doi: 10.1038/ng0895-409.
- [3] L. Houghton, “The ectodysplasin pathway in feather tract development,” *Development*, vol. 132, no. 5, pp. 863–872, Feb. 2005, doi: 10.1242/dev.01651.
- [4] M. Priolo and C. Laganà, “Ectodermal dysplasias: a new clinical-genetic classification,” *J. Med. Genet.*, vol. 38, no. 9, pp. 579–585, Sep. 2001, doi: 10.1136/jmg.38.9.579.
- [5] L. Kleinesudeik, K. Rohde, and S. Fulda, “Regulation of the antiapoptotic protein cFLIP by the glucocorticoid Dexamethasone in ALL cells,” *Oncotarget*, vol. 9, no. 23, pp. 16521–16532, Mar. 2018, doi: 10.18632/oncotarget.24782.
- [6] X. Du *et al.*, “Expression and biological significance of c-FLIP in human hepatocellular carcinomas,” *J. Exp. Clin. Cancer Res. CR*, vol. 28, p. 24, Feb. 2009, doi: 10.1186/1756-9966-28-24.

A**B****C**positive control cell line **HepG2**Negative control cell line **HeLa**

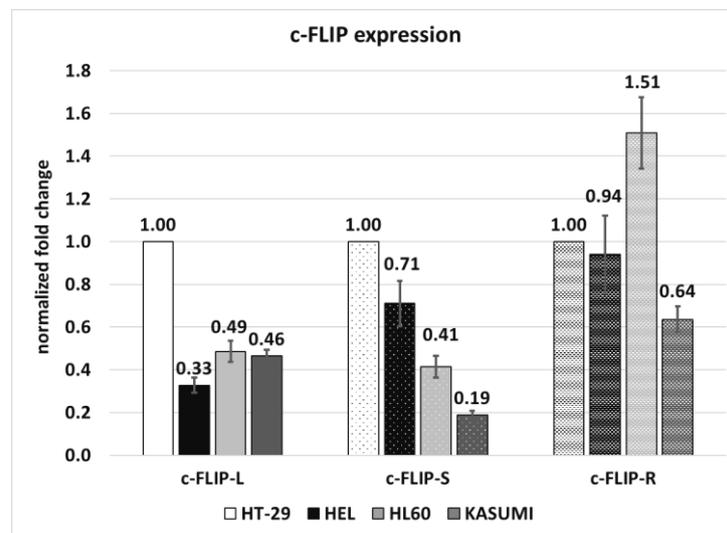
■ auto
■ CTRL AB
■ Eda-A1

HEL**HL60****Kasumi-1**

A



B



C

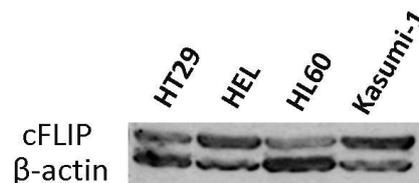
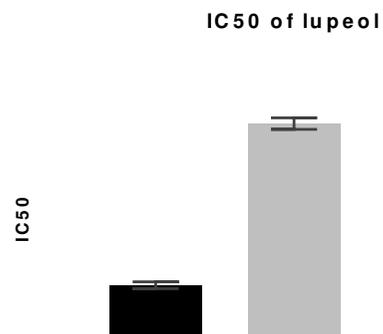


Figure 2: Expression of EDARADD and c-FLIP in AML cell lines. (A) mRNA expression of EDARADD assessed by RT-qPCR normalized to 28S as housekeeping gene (N=3; n=3). (B) mRNA expression of the three c-FLIP isoforms (c-FLIP_L, c-FLIP_S and c-FLIP_R) assessed by RT-qPCR normalized to 28S as a housekeeping gene and to HT29 mRNA expression as a positive control (N=3; n=3). (C) total c-FLIP protein expression by western blot in 3 AML cell lines compared to HT29 as positive control. (*Representative experiment of N=3.*)

A



B

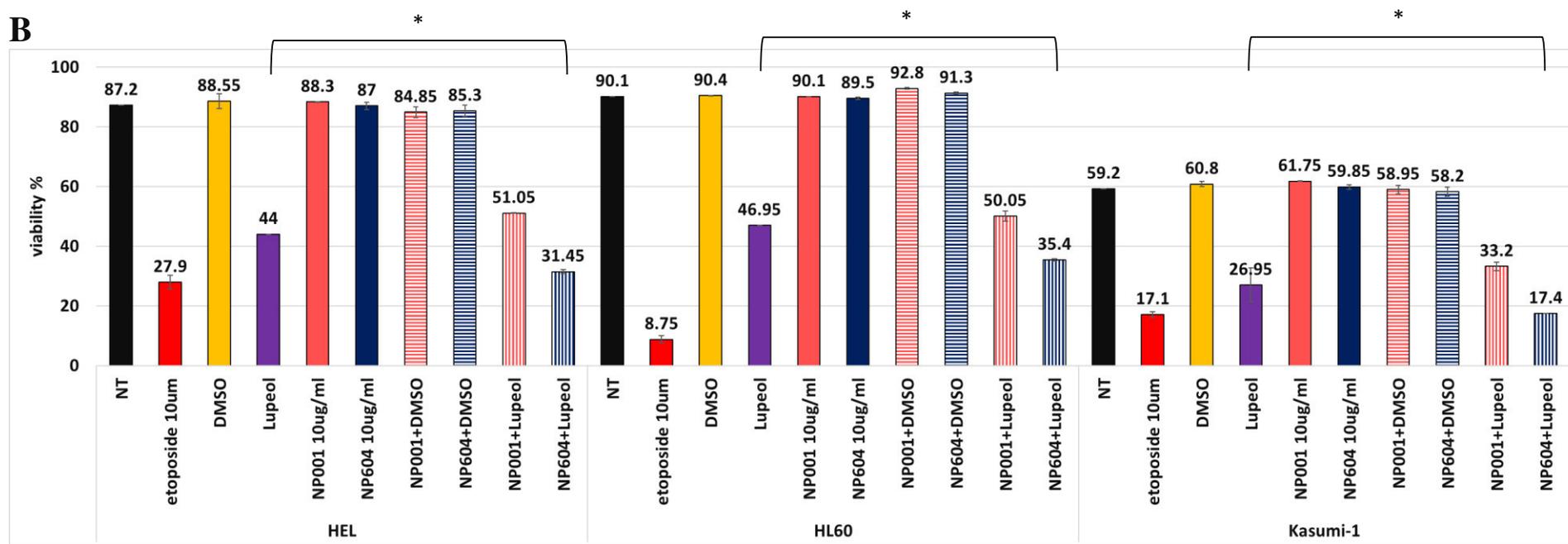


Figure 3: Evaluation of the effect of anti-EdaA1 (NP604) in combination with lupeol on AML cell viability. (A) IC50 of lupeol assessed by MTT. Treatment was done for 72 hours and cell mortality was compared to non-treated cells (N=3; n=3). (B) analysis of the viability of AML cell lines after NP604 treatment in combination with lupeol by flow cytometry after annexinV/pi labelling. Etoposide 10um was used as a positive control for annexinV/pi signal, and NP001 was used as a IgG isotype control for NP604 (N=3; n=3) *p<0.05.

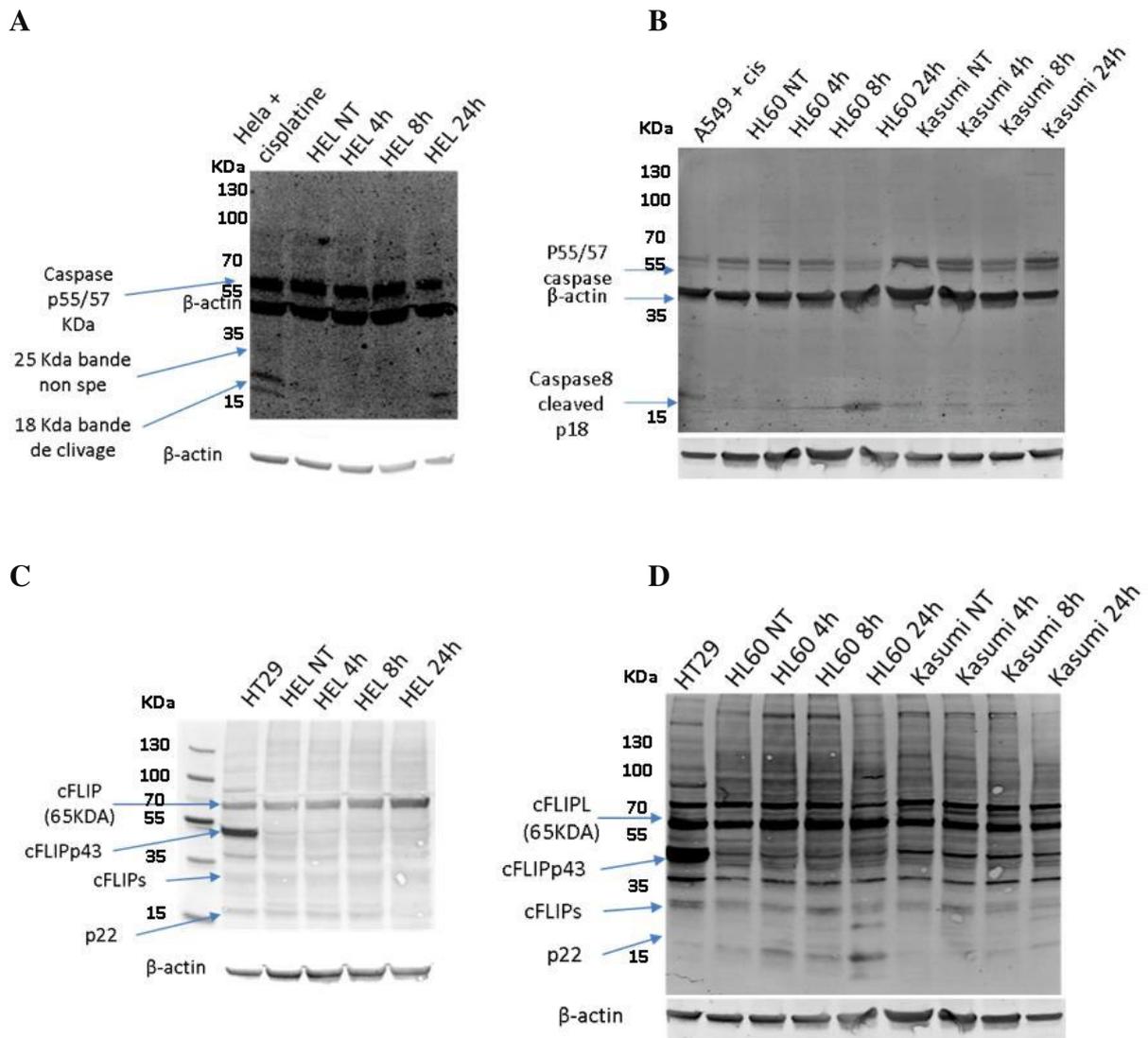
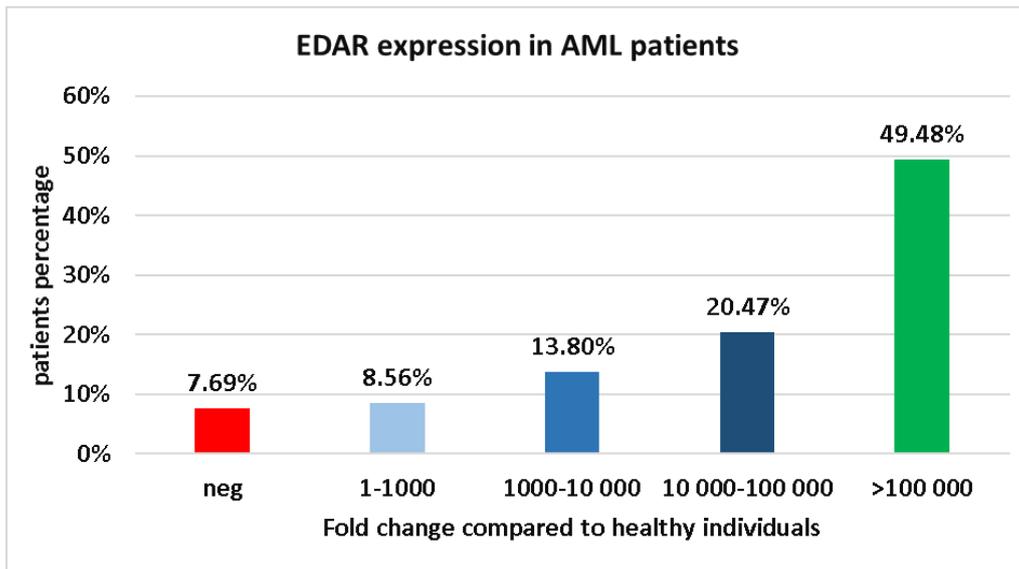
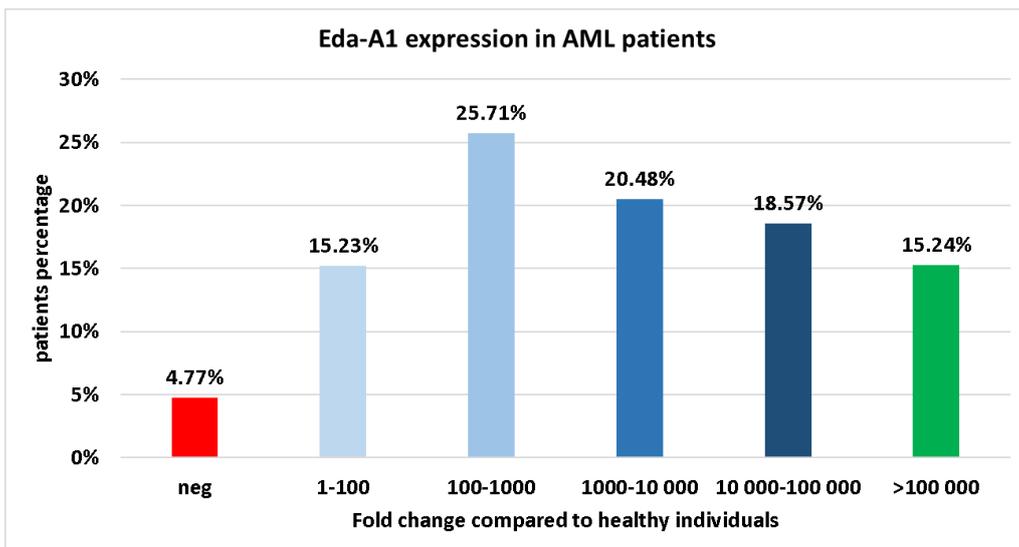


Figure 4: Expression and cleavage of procaspase-8 and c-FLIP in AML cell lines after lupeol treatment. (A and B) Procaspase-8 cleavage evaluation in HEL, HL60 and Kasumi-1. (C and D) Expression and cleavage assessment of c-FLIP in HEL, HL60 and Kasumi-1. (Representative experiment of two realized experiments in total N=2.)

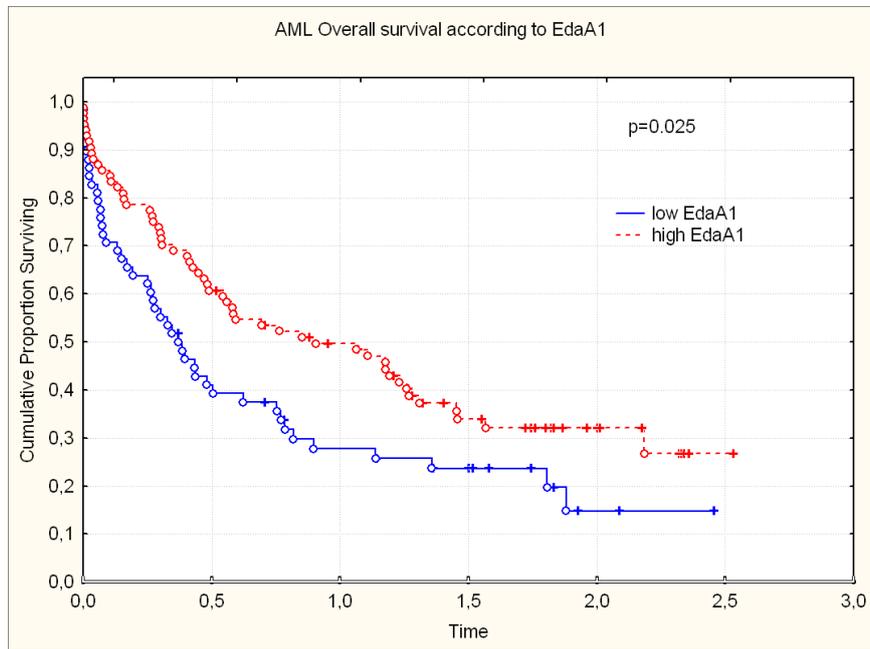
A



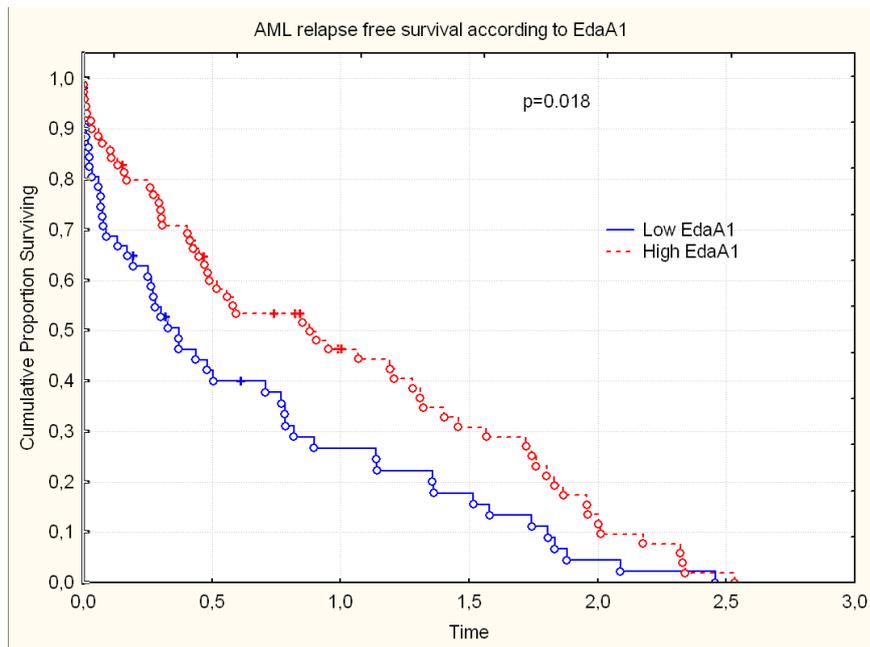
B



C



D



E



F

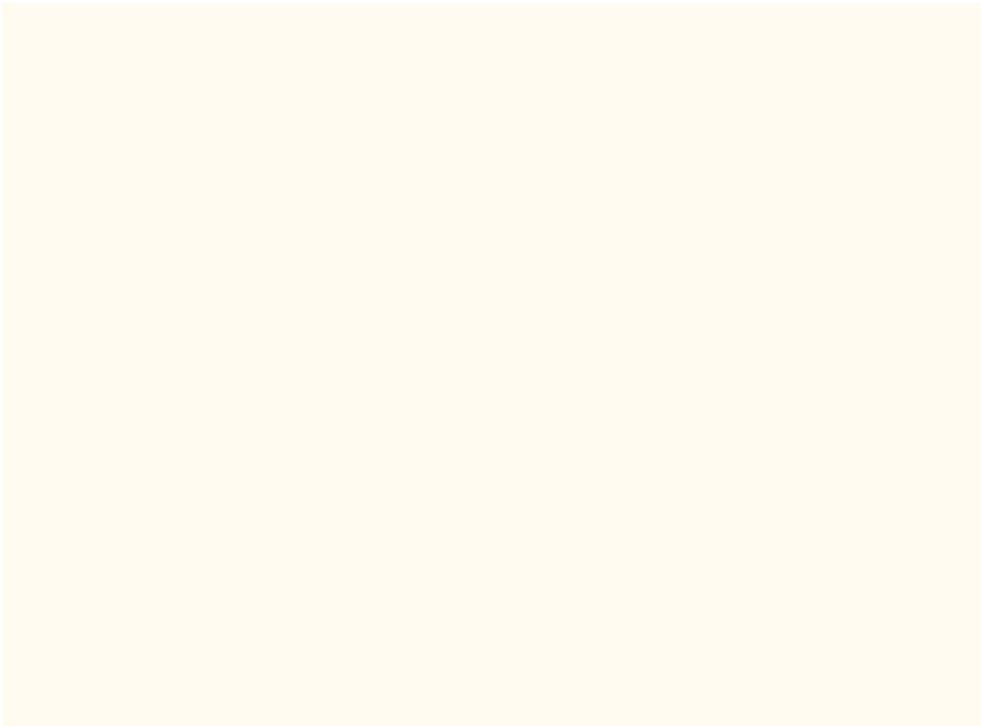
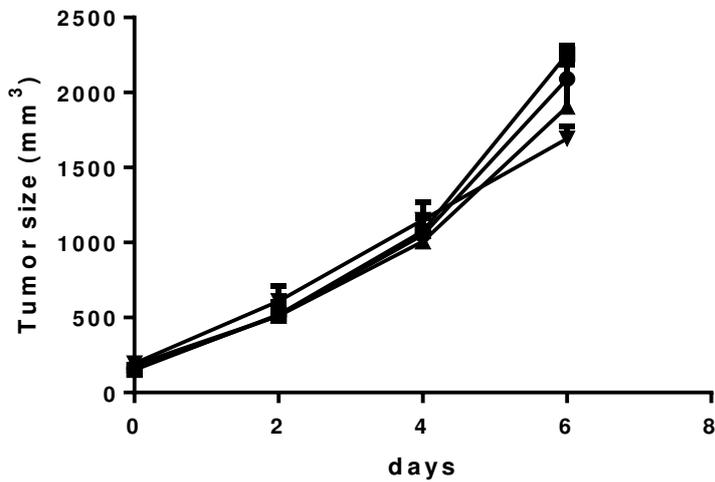


Figure 5: Evaluation of the expression and the prognostic value of Eda-A1 and EDAR in AML patients. (A and B) Expression of Eda-A1 and EDAR assessed by RT-qPCR in AML patients' samples showing an overexpression of Eda-A1 and EDAR respectively. (C, D, E, F)

evaluation of the prognostic value of EdaA1 (C,D) and EDAR (E,F) on overall survival and event-free survival in AML patients.



Supplementary figure 1: **Effect of NP604 treatment on ectopically grafted, AML tumor growth, in SCID mice. (5 mice per group) *p<0.05**

Discussion Générale

Nétrine-1 molécule-clé pour la survie des lymphomes non-hodgkiniens et des myélomes multiples.

Les voies de signalisation activées par la fixation de la nétrine-1 sur ses deux récepteurs principaux, DCC et UNC5B, sont bien décrites, pourtant l'exploration de son rôle comme une molécule cible dans les cancers reste limitée. La nétrine-1 est surexprimée dans plusieurs types de cancers tels que le cancer du sein, le cancer colorectal, le cancer de poumons, le cancer de l'ovaire, le neuroblastome et le médulloblastome [397], [400]–[402], [407], [541]. Une étude réalisée en 2012, a démontré l'effet de la sécrétion paracrine de la nétrine-1 comme un facteur de croissance ayant un effet dans la lymphangiogenèse des cancers[542]. Plus récemment, Yin *et al.* a montré le rôle crucial dont la nétrine-1 joue dans la transition épithélio mésenchymateuse des cellules du cancer gastrique métastatique[543]. Dans les lignées cellulaires tumorales et les échantillons de tumeurs où la nétrine-1 est faiblement exprimée, le traitement avec des médicaments conventionnels, comme la doxorubicine, le paclitaxel et le cisplatine, est souvent associé à une augmentation de l'expression de la nétrine-1 et de ses récepteurs[406]. En conséquence, la combinaison de médicaments conventionnels avec l'anti-nétrine-1 augmente la mort des cellules tumorales *in vitro* et inhibe la croissance tumorale *in vivo*. Ce résultat suggère que, lorsque les tumeurs expriment des faibles niveaux de nétrine-1, une combinaison de médicaments conventionnels et des médicaments inhibant l'interaction nétrine-1-récepteurs pourrait amplifier la réponse induite par la chimiothérapie.

En effet, un anticorps monoclonal humanisé anti-nétrine-1 produit par NETRIS Pharma au sein du centre de cancérologie de Lyon a montré une réduction de la croissance des modèles précliniques de LNH [436]. Cet anticorps est passé ensuite en phase clinique I pour évaluer sa cytotoxicité chez les patients souffrant de cancers avancés et métastatiques. Cependant

l'évaluation de l'effet de l'interférence avec la nétrine-1 dans les hémopathies reste peu explorée.

Dans notre projet, nous avons analysé l'expression de la nétrine-1 et de ses récepteurs dans un panel constitué de différentes lignées cellulaires humaines appartenant à des différentes catégories d'hémopathies ; la leucémie aiguë myéloïde, la leucémie aiguë lymphoïde, le lymphome non-hodgkinien et le myélome multiple. Cette analyse a démontré pour la première fois, une expression de la nétrine-1 et de ses récepteurs DCC et UNC5B dans les différents types d'hémopathies mais à des niveaux d'expression différents. En effet, les lignées de LNH et de myélome multiple sont les deux seules catégories dans lesquels nous avons pu détecter une surexpression de la nétrine-1 et de ces récepteurs au niveau protéique. De ce fait, notre étude s'est focalisée sur ces deux types d'hémopathies. Ces résultats sont cohérents avec les données préliminaires de la bibliographie réalisés sur le LNH et avec nos propres travaux de criblages réalisés au sein des Hospices Civils de Lyon qui ont montré une expression importante de la nétrine-1 et de ces récepteurs chez les patients souffrant de myélome multiple. Suite à ces données, nous avons évalué dans ces deux types d'hémopathies l'effet de l'interférence avec la nétrine-1 et ses récepteurs dans des modèles cellulaires précliniques et également sur des échantillons de patients de myélome multiple en utilisant l'anticorps anti-nétrine-1 produit par NETRIS Pharma.

Nos travaux réalisés sur l'exploration du rôle de la nétrine-1 dans le lymphome non-hodgkinien, montrent que le ciblage de la nétrine-1 à la fois paracrine et autocrine dans l'environnement des cellules *in vitro* est capable d'impacter la survie des cellules dans le modèle de co-culture mis en place quelles que soient les conditions de culture. Nos résultats montrent que plus l'expression de la nétrine-1 dans le microenvironnement est élevée, plus l'effet du traitement anti-nétrine-1 sur la viabilité cellulaire est remarquable. Ceci évalue l'importance du traitement

anti-nétrine-1 dans les cancers où la nétrine-1 est potentiellement abondante dans le microenvironnement tumoral, surtout dans le cas du lymphome qui touche des tissus solides. Également, nos analyses ont montré que la surexpression de la nétrine-1 de façon exogène dans un modèle de LNH augmente la prolifération cellulaire. In vivo, un traitement avec l'anti-nétrine-1 pour des souris greffées par des tumeurs LNH humaines a démontré une baisse de la croissance tumorale. Alors, nos résultats *in vivo* corrélèrent bien avec ce qui a été décrit dans la littérature et avec nos résultats *in vitro*[436]. Par contre, on n'a pas pu observer l'effet de la surexpression exogène de la nétrine-1 dans nos modèles précliniques. De ce fait, le mécanisme par lequel la surexpression de la nétrine-1 aide à l'augmentation de la croissance tumorale des LNH reste à explorer.

De plus, nous avons montré pour la première fois, que la nétrine-1 et ses récepteurs pourraient être des cibles potentielles dans le myélome multiple, une maladie qui reste actuellement incurable. Nos analyses primaires des échantillons de moelle osseuse, qui montrent une expression plus élevée de la nétrine-1 et de ces récepteurs chez les patients atteints de myélome multiple, suggèrent que le traitement anti-nétrine-1 pourrait impacter la survie des plasmocytes cancéreux. Les résultats obtenus du traitement des lignées cellulaires humaines qui surexpriment la nétrine-1 et ses récepteurs suggèrent que la combinaison du traitement anti-nétrine-1 avec un inhibiteur de protéasome semble diminuer la viabilité cellulaire. Également, la combinaison de la dexaméthasone, un glucocorticoïde utilisé dans le traitement des myélomes multiples, avec le NP137, ralentit efficacement la croissance tumorale dans un modèle préclinique. Ces résultats semblent être cohérents avec ce qui a été décrit par Paradisi *et al* en 2013 [406], mais les mécanismes moléculaires sous-jacents restent à explorer. Finalement, les résultats obtenus de l'exposition des échantillons frais de moelle osseuse de patients atteints de myélome multiple à l'anti-nétrine-1 suggèrent que ce traitement réduit la

viabilité des plasmocytes mais les mécanismes par lesquels leur viabilité est impactée restent à découvrir ultérieurement.

L'ectodysplasine A1 : une cible potentielle dans les Leucémies Aigue Myéloïdes.

EDAR, un récepteur de la famille des TNFs, partage de nombreuses caractéristiques structurales et fonctionnelles avec les récepteurs de mort qui appartiennent à cette famille. De façon similaire à TNFR1, il a été démontré que la liaison du ligand Eda-A1 sur EDAR induit l'activation de NF- κ B, par EDARADD, à travers un complexe composé de TRAF6, TAB2 et TAK1[544], [545]. Une étude récente suggère qu'EDAR peut réguler la viabilité cellulaire en absence de son ligand EdaA1, par une voie de signalisation différente de celle qui implique Nf- κ B. En effet, il a été récemment démontré qu'en absence de son ligand, EDAR interagit avec la caspase-8 et conduit à l'induction de l'apoptose [481]. Cette étude suggère également que ce récepteur joue le rôle d'un suppresseur de tumeur dans le cancer, plutôt qu'un récepteur de mort, mais d'une autre part, il a été démontré que l'apoptose induite par la surexpression d'EDAR était inhibée lorsque les cellules ont été traitées par EdaA1 recombinant[481]. Ceci soutient l'hypothèse que ce récepteur se comporte comme un récepteur à dépendance.

Bien qu'il ait été démontré qu'EDAR interagit avec la caspase-8, le mécanisme par lequel EDAR déclenche la mort cellulaire est encore peu connu, notamment dans les tumeurs malignes hématologiques. Cependant, c-FLIP, une protéine régulatrice de l'apoptose, est fréquemment surexprimée dans les cancers solides et dans les hémopathies malignes[499], [546], inhibe la voie de l'apoptose via les caspases. En fait, une forte expression de c-FLIP, est souvent corrélée à un mauvais pronostic dans les hémopathies comme la leucémie aiguë lymphoïde, la leucémie aiguë myéloïde et le lymphome diffus à grandes cellules B [547]–[549]. Sa sous-régulation dans un modèle de carcinome hépatique diminue la résistance aux molécules cytotoxiques utilisées en chimiothérapie comme la doxorubicine [500]. Lara Kleinesudeik et ses collègues

ont démontré que le traitement combiné d'un modèle de leucémie aiguë lymphoïde par BV6 et de dexaméthasone diminue significativement l'expression de c-FLIP_L par un processus post-transcriptionnel. Ils ont démontré aussi que la surexpression de c-FLIP diminue la sensibilité des LAL à ce type de combinaison de traitement[547]. Afin de surmonter la chimiorésistance d'un modèle de cancer pancréatique à la thérapie par TRAIL, en 2009 Imtiyaz Murtaza et ses collègues avaient démontré que la suppression de c-FLIP par le lupéol, un tri-terpène diététique, combinée au traitement par TRAIL, réduit significativement la viabilité cellulaire du modèle utilisé, par rapport à la monothérapie par TRAIL et ceci en activant le clivage de la caspase-8[528].

Dans cette partie nous avons évoqué pour la première fois le rôle de l'ectodysplasine A1 et son récepteur EDAR dans le maintien de la survie de la leucémie myéloïde aiguë qui est fréquemment résistante aux chimiothérapies conventionnelles. De plus, nos résultats montrent que ces protéines sont surexprimées chez les patients atteints de cette maladie suggérant un potentiel thérapeutique pour leur ciblage dans les LAM. Nos résultats étaient les premiers de leur genre dans le domaine de l'hématologie, rapportant pour la première fois la surexpression de l'EdaA1 et d'EDAR dans les lignées cellulaires humaines d'AML. De plus, nos résultats suggèrent que les lignées cellulaires AML expriment également les trois isoformes de c-FLIP ainsi qu'EDARADD qui peut jouer le rôle d'une clé de serrure pour relier la résistance médiée par c-FLIP à la signalisation EDAR. Ceci pointe l'étude plus vers le co-ciblage à la fois de notre récepteur à dépendance potentiel et d'une protéine de résistance clé. De manière intéressante, nos résultats montrent que le ciblage de l'EDAA1 avec un anticorps monoclonal en monothérapie ne suffit pas pour déclencher une apoptose cellulaire majeure. Au contraire, lorsque nous avons combiné le traitement anti-EdaA1 à un inhibiteur de c-FLIP, EDAR induisait l'apoptose suggérant un rôle de c-FLIP dans la signalisation d'EDAR comme récepteur à dépendance. Ces observations soutiennent le rôle d'EDAR en tant que récepteur de

dépendance et corrélèrent bien avec ce qui a été décrit dans la littérature concernant la signalisation intracellulaire des récepteurs de mort de type TNF.

Nos observations ont montré que le lupéol, l'inhibiteur potentiel de c-FLIP agit à la fois sur le clivage de c-FLIP et sur l'activation de la caspase-8, suggérant que l'inhibition de c-FLIP aide à vaincre la résistance aux thérapies ciblées EDAR. De plus, ces observations suggèrent que l'interaction de la caspase-8 avec EDARADD pourrait être cruciale pour le déclenchement de l'apoptose. Mais d'autres analyses seront nécessaires pour démontrer l'interaction physique de la caspase-8 avec EDARADD.

Concernant le rôle clinique de ces protéines, peu d'études ont été réalisées sur des patients cancéreux mais seules quelques données non publiées du TCGA montrent qu'EDAR et EdaA1 sont surexprimés chez une grande partie des patients atteints de LAM. Notre analyse était conforme à ce qui avait été observé, montrant une surexpression de l'EdaA1 et d'EDAR dans des échantillons de patients atteints de LAM. Néanmoins, la corrélation de l'expression de ce couple avec le pronostic des patients atteints de LAM doit encore être confirmée.

En résumé, nous avons démontré que : EdaA1 et EDAR sont en effet surexprimés dans les LAM et que le ciblage d'EDAA1 dans une thérapie combinée comprenant un inhibiteur de c-FLIP pourrait constituer une option thérapeutique prometteuse dans la leucémie myéloïde aiguë. De plus, nos résultats suggèrent que la voie de signalisation d'EDAR nécessite l'implication de la caspase-8 afin d'induire l'apoptose cellulaire dans les LAM en l'absence de son ligand.

Perspectives

La restauration des voies de signalisation pro-apoptotiques dans les cellules cancéreuses humaines constitue aujourd'hui l'une des principales stratégies thérapeutiques dans le développement de médicaments. Cela étant le cas, les DR sont considérés comme des cibles prometteuses pour les traitements contre le cancer, et reçoivent donc de plus en plus d'attention. La liste des DR est certainement encore non définitive ; les études actuelles et futures montreront très probablement la capacité de certains récepteurs à induire l'apoptose lorsqu'ils ne sont pas liés à leur ligand.

Perspectives du travail sur le ciblage de la nétrine-1 dans le myélome multiple.

Evaluation de l'effet de la diminution de l'expression de DCC dans des modèles cellulaires de myélome multiple.

Des études ont déjà montré que la modification de l'expression de la nétrine-1 ou de ses récepteurs modifient le comportement de certains cancers ; dans le neuroblastome la sous-expression de la nétrine-1 par un siRNA augmente l'activité des caspases et dans le mélanome la surexpression de DCC a diminué la croissance tumorale dans un modèle murin. De ce fait, nous pourrions évaluer l'effet de la variation des niveaux d'expression de la nétrine-1 ou de ses récepteurs (DCC ou UNC5B) sur la viabilité cellulaire, *in vitro*, dans des modèles de myélome multiple, en utilisant des siRNA ou des plasmides codant pour ces protéines. (Ex : Incucyte caspase test - AnnV/IP), sur la prolifération cellulaire *in vitro* (en utilisant la CFSE) ainsi que sur la croissance tumorale *in vivo*.

*Évaluer l'effet de la combinaison du NP137 avec d'autres MM *in vitro* et la croissance tumorale *in vivo*.*

Les résultats obtenus suggèrent que la combinaison du bortézomib, un agent cytotoxique de chimiothérapie avec l'anti-nétrine-1 NP137 semble réduire significativement la viabilité des lignées cellulaires de myélome multiple. En conséquence, nous pourrions associer l'anti-nétrine-

1 *in vitro* puis *in vivo* avec d'autres molécules cytotoxiques dont les immunomodulateurs « IMiDs » (ex : lenalidomide etc.), des anticorps monoclonaux (ex : anti-CD38 ; anti-CD138) ou des anticorps bispécifiques ou immunoconjugués (ex : CD3-BCMA).

Évaluer la valeur pronostique de la nétrine-1 et de ses récepteurs DCC et UNC5 dans le myélome multiple

La détermination des variables pronostiques, fournit premièrement des informations sur la biologie et l'histoire naturelle de la maladie. Deuxièmement, elle aide à la détermination des stratégies de traitement appropriées qui peuvent être optimisées en fonction des facteurs pronostiques d'un patient individuel. Troisièmement, elle constitue un facteur essentiel dans la conception, la conduite et l'analyse des essais cliniques. Finalement, elle donne une idée sur le risque de récurrence ou de décès. Pour cela, il sera important de déterminer la valeur pronostique de la nétrine-1 et de ses récepteurs dans le myélome multiple, en analysant l'expression dans des échantillons provenant de patients atteints de myélome multiple (selon le nombre des échantillons : analyse RTqPCR ou cytométrie en flux).

Etudier l'effet de l'expression de la nétrine-1 et de ses récepteurs sur la réponse des patients aux chimiothérapies dont le bortezomib

Afin de mieux comprendre le rôle de la nétrine-1 et de ses récepteurs DCC et UNC5B dans la résistance du myélome multiple à la chimiothérapie, une évaluation de la réponse des myélomes multiples exprimant différents niveaux de nétrine-1 aux agents de chimiothérapie pourrait être faite et ceci par exemple à travers des tests de cytotoxicité *ex vivo*, sur des échantillons de moelle osseuse ayant différents niveaux de nétrine-1.

Perspectives du travail sur le ciblage de EDA/EDAR dans la LAM.

Le récepteur à ectodysplasine, un récepteur de type TNF, possède une protéine adaptatrice EDARADD associée à son domaine de mort. Cette protéine adaptatrice interagit via son propre DD avec le DD d'EDAR. Pour transmettre la signalisation, EDARADD possède un autre domaine non défini, qui n'est pas un DED, et qui a été suggéré de recruter des TRAFs pour l'activation de la voie NF- κ B.

Malgré qu'il a été prouvé que la présence d'EDAR endogène dans les embryons n'a pas été associée avec une signalisation apoptotique, l'accumulation de données soutient l'idée qu'en plus de sa capacité bien caractérisée à déclencher l'activation de NF- κ B lors de la liaison du ligand, EDAR induit l'apoptose quand il a été surexprimé dans des HEK293 via un mécanisme dépendant de la caspase, ce qui en fait un acteur au carrefour entre les membres de la famille TNFR et les DR. Cependant il n'y a toujours pas de rationnel moléculaire par lequel EDAR serait sensé interagir avec caspase-8 ou FLIP à l'inverse de ce qui a été décrit dans le cas des récepteurs à mort (ex FAS/FASL). Aujourd'hui, les études ont tendance à considérer EDAR comme un nouveau suppresseur de tumeur. Il semble être sous-régulé dans certains cancers humains conduisant probablement à l'inhibition de l'apoptose ou surexprimé avec son ligand dans d'autres cancers, ce qui conduit également à l'activation de voies de signalisation anti-apoptotiques. Nos observations suggèrent que ce dernier cas peut se produire chez des patients atteints de LAM, ce qui force l'importance d'étudier EDAR et sa capacité à induire l'apoptose en l'absence de son ligand. Tout cela nous permet de postuler que le paradigme des DRs peut ouvrir des perspectives thérapeutiques dans le traitement du cancer. Dans notre étude, afin de mieux comprendre la voie de signalisation par laquelle EDAR induit l'apoptose dans la LAM, d'autres postulons, hypothèses et tests requis sont énumérés ci-dessous.

Modulation de la signalisation NF- κ B après traitement par NP604.

Après fixation de l'EDA sur son récepteur EDAR, le domaine de mort (DD) intracellulaire du récepteur interagit avec le DD d'EDARADD qui par suite interagit avec des TRAFs pour induire l'activation de la voie NF- κ B expliquant l'augmentation des signaux de survie cellulaire en présence de l'EDA. Cependant il n'a pas été décrit qu'en absence de l'EDA, il y aura diminution de l'activation de NF- κ B. Disposant d'un anticorps humanisé thérapeutique pour le ciblage de l'EDA, nous suggérons l'étude de l'expression et de l'activation de NF- κ B en inhibant l'interaction de l'EDA avec EDAR dans des modèles cellulaires de LAM. Cette expérience permet de mieux expliquer les mécanismes par lesquels EDAR influe la viabilité des LAM.

L'expression de c-FLIP module la capacité du NP604 à induire l'apoptose dans les lignées cellulaires de LAM.

Les résultats obtenus suggèrent que le NP604 semble être une thérapie ciblée potentielle dans la LAM. L'implication de c-FLIP dans la voie de signalisation EDAR nous conduit à évaluer l'effet du NP604 sur la viabilité des cellules AML lors de la variation des niveaux d'expression de c-FLIP. L'expression de c-FLIP peut être modifiée, soit en surexprimant la protéine, soit en la sous-régulant. L'objectif serait de démontrer que l'expression de c-FLIP influence l'effet de NP604 sur les cellules de LAM. Les cellules seront transfectées soit par un plasmide codant pour c-FLIP, soit par un siRNA c-FLIP et ensuite leur sensibilité au traitement par NP604 est évaluée et comparée aux cellules contrôles. L'efficacité du traitement NP604 en combinaison avec lupéol peut être aussi évaluée sur des cellules qui surexpriment c-FLIP.

L'interaction d'EDARADD avec c-FLIP maintient l'homéostasie des cellules tumorales.

Ensuite, nous viserions à étudier l'interaction entre c-FLIP et EDARADD et prouver que l'interaction entre EDARADD et c-FLIP assure la survie des cellules tumorales. Pour répondre

à l'hypothèse, nous utiliserons la technique du Proximity Ligand Assay (PLA) pour visualiser l'interaction EDARADD / c-FLIP. Dans les détails, nous voulons montrer que lors de la régulation négative de c-FLIP, le signal de son interaction avec EDARADD diminuera, en accompagnant une augmentation de l'apoptose. Cela peut également être fait de manière opposée par la surexpression de c-FLIP. Cependant, nous pouvons également émettre l'hypothèse que lorsque nous régulons à la baisse c-FLIP, la capacité du NP604 à induire des signaux d'apoptose augmentera également.

L'inhibition de c-FLIP améliore l'apoptose par l'interaction de la caspase-8 avec EDARADD

Pour mieux examiner les interactions protéiques survenant dans la voie de signalisation EDAR dans la LAM, notre équipe se concentrera sur l'étude des interactions "physiques" entre procaspase-8, EDARADD et c-FLIP. Notre objectif serait de prouver que l'interaction EDARADD / procaspase-8 active l'apoptose extrinsèque uniquement lorsque le c-FLIP est inhibé soit par le lupéol, soit spécifiquement par un siRNA FLIP. En d'autres termes, lorsque c-FLIP est inhibé, l'interaction EDARADD / procaspase-8 est restaurée. Pour le prouver, nous utiliserons la technique PLA. Pour apporter plus de réponses à l'hypothèse, notre équipe s'intéresse à l'étude de l'activité de la caspase-8. Le but serait de démontrer que c-FLIP pourrait inverser l'activité de la caspase-8 en se liant à EDARADD. Cette liaison dépend, comme mentionné précédemment, des niveaux d'expression de c-FLIP. Nous prévoyons une diminution ou une inhibition totale du clivage de la procaspase-8 dans les cellules surexprimant c-FLIP. D'un autre côté, une expression normale de la procaspase-8 devrait être observée dans les cellules où c-FLIP est sous-régulé.

La diminution d'EDAR et l'absence d'EDARADD intracellulaires, en particulier l'apoptose dans les lignées cellulaires de LAM.

De plus, pour étudier correctement le rôle d'EDAR dans l'induction de l'apoptose dans les lignées cellulaires LAM, notre prochaine étape serait de concevoir un système CRISPR (Cas9) pour supprimer EDAR. Cela se fera en collaboration avec l'équipe du Dr Pascal Schneider de l'université de Lausanne. La délétion d'EDAR aidera à comprendre à la fois l'importance moléculaire et thérapeutique de son existence. Il vise à prouver que toutes les voies de signalisation intracellulaires décrites précédemment, notamment l'apoptose, dépendent principalement de la présence d'EDAR. Par conséquent, son absence implique la perte de l'interaction EDRADD / procaspase-8 et par conséquent l'abolition de l'apoptose dans nos modèles cellulaires. Puisqu'il a été démontré que la surexpression d'EDAR est suffisante pour induire l'apoptose, nous viserons à montrer également que la surexpression d'EDAR et de c-FLIP simultanément dans des lignées cellulaires AML garantit la survie cellulaire en inhibant l'apoptose. De même, pour montrer que la surexpression d'EDAR en présence de l'Eda-A1 recombinante conduit à la survie cellulaire en inhibant la procaspase-8. En conclusion, nous cherchons avec nos travaux à démontrer l'efficacité du ciblage de la voie de signalisation EDAR en tant que thérapie potentielle pour améliorer le pronostic des patients atteints de LAM et prolonger leur espérance de vie.

EdaA1 pourrait être un nouveau facteur pronostique dans les LAM

Les résultats de rt-PCR obtenus sur notre série de 220 patients suggèrent que le niveau d'expression de l'EdaA1, mais pas d'EDAR, est corrélé avec la survie sans rechute et la survie sans progression. Ces premiers résultats doivent être confrontés à ceux issus d'autres séries telles que le TCGA et doivent prendre en compte les facteurs pronostiques classiques, tels que la cytogénétique, afin de déterminer si EdaA1 est un facteur pronostique indépendant.

Dans notre série un niveau élevé d'ARN de l'EdaA1 était corrélé à une meilleure survie chez les patients atteints de LAM. Si cela se vérifiait au niveau protéique il s'agirait d'une

observation contre-intuitive dans la mesure où la surexpression d'un ligand à dépendance a plutôt été rapportée comme étant associée à une plus grande agressivité tumorale.

Références bibliographiques

- [1] K. R. Shankland, J. O. Armitage, and B. W. Hancock, "Non-Hodgkin lymphoma," *Lancet Lond. Engl.*, vol. 380, no. 9844, pp. 848–857, Sep. 2012, doi: 10.1016/S0140-6736(12)60605-9.
- [2] E. Maeda *et al.*, "Spectrum of Epstein-Barr virus-related diseases: a pictorial review," *Jpn. J. Radiol.*, vol. 27, no. 1, pp. 4–19, Jan. 2009, doi: 10.1007/s11604-008-0291-2.
- [3] E. Linke-Serinsöz, F. Fend, and L. Quintanilla-Martinez, "Human immunodeficiency virus (HIV) and Epstein-Barr virus (EBV) related lymphomas, pathology view point," *Semin. Diagn. Pathol.*, vol. 34, no. 4, pp. 352–363, Jul. 2017, doi: 10.1053/j.semmp.2017.04.003.
- [4] R. Mahieux and A. Gessain, "HTLV-1 and associated adult T-cell leukemia/lymphoma," *Rev. Clin. Exp. Hematol.*, vol. 7, no. 4, pp. 336–361, Dec. 2003.
- [5] C. S. Rabkin *et al.*, "Prospective study of hepatitis C viral infection as a risk factor for subsequent B-cell neoplasia," *Blood*, vol. 99, no. 11, pp. 4240–4242, Jun. 2002, doi: 10.1182/blood-2002-01-0226.
- [6] M. Ponzoni and A. J. M. Ferreri, "Bacteria associated with marginal zone lymphomas," *Best Pract. Res. Clin. Haematol.*, vol. 30, no. 1–2, pp. 32–40, Jun. 2017, doi: 10.1016/j.beha.2017.01.001.
- [7] J. Peveling-Oberhag, L. Arcaini, M.-L. Hansmann, and S. Zeuzem, "Hepatitis C-associated B-cell non-Hodgkin lymphomas. Epidemiology, molecular signature and clinical management," *J. Hepatol.*, vol. 59, no. 1, pp. 169–177, Jul. 2013, doi: 10.1016/j.jhep.2013.03.018.
- [8] M. R. Pinzone *et al.*, "Non-AIDS-defining cancers among HIV-infected people," *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.*, vol. 16, no. 10, pp. 1377–1388, Oct. 2012.
- [9] K. E. Smedby, J. Askling, X. Mariette, and E. Baecklund, "Autoimmune and inflammatory disorders and risk of malignant lymphomas--an update," *J. Intern. Med.*, vol. 264, no. 6, pp. 514–527, Dec. 2008, doi: 10.1111/j.1365-2796.2008.02029.x.
- [10] M. Humphreys, P. Lavery, C. Morris, and N. Nevin, "Klinefelter syndrome and non-Hodgkin lymphoma," *Cancer Genet. Cytogenet.*, vol. 97, no. 2, pp. 111–113, Sep. 1997, doi: 10.1016/s0165-4608(96)00386-x.
- [11] J. C. Argyle, C. R. Kjeldsberg, J. Marty, A. O. Shigeoka, and H. R. Hill, "T-cell lymphoma and the Chediak-Higashi syndrome," *Blood*, vol. 60, no. 3, pp. 672–676, Sep. 1982.
- [12] Tobias J and Hochhauser D, *Cancer and its Management (7th ed.)*. Wiley-Blackwell, 2015.
- [13] B. Lauby-Secretan *et al.*, "Carcinogenicity of polychlorinated biphenyls and polybrominated biphenyls," *Lancet Oncol.*, vol. 14, no. 4, pp. 287–288, Apr. 2013, doi: 10.1016/S1470-2045(13)70104-9.
- [14] C. Zani, G. Toninelli, B. Filisetti, and F. Donato, "Polychlorinated biphenyls and cancer: an epidemiological assessment," *J. Environ. Sci. Health Part C Environ. Carcinog. Ecotoxicol. Rev.*, vol. 31, no. 2, pp. 99–144, 2013, doi: 10.1080/10590501.2013.782174.

- [15] S. Kramer, S. M. Hikel, K. Adams, D. Hinds, and K. Moon, “Current status of the epidemiologic evidence linking polychlorinated biphenyls and non-hodgkin lymphoma, and the role of immune dysregulation,” *Environ. Health Perspect.*, vol. 120, no. 8, pp. 1067–1075, Aug. 2012, doi: 10.1289/ehp.1104652.
- [16] “Non-Hodgkin Lymphoma - Cancer Stat Facts,” *SEER*. <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/nhl.html> (accessed Jan. 22, 2020).
- [17] L. S. Evans and B. W. Hancock, “Non-Hodgkin lymphoma,” *Lancet Lond. Engl.*, vol. 362, no. 9378, pp. 139–146, Jul. 2003, doi: 10.1016/S0140-6736(03)13868-8.
- [18] N. G. Alliance (UK), *Epidemiology*. National Institute for Health and Care Excellence (UK), 2016.
- [19] G. Lenz and L. M. Staudt, “Aggressive lymphomas,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 362, no. 15, pp. 1417–1429, Apr. 2010, doi: 10.1056/NEJMra0807082.
- [20] D. Jung, C. Giallourakis, R. Mostoslavsky, and F. W. Alt, “Mechanism and control of V(D)J recombination at the immunoglobulin heavy chain locus,” *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 24, pp. 541–570, 2006, doi: 10.1146/annurev.immunol.23.021704.115830.
- [21] H. Nogai, B. Dörken, and G. Lenz, “Pathogenesis of non-Hodgkin’s lymphoma,” *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.*, vol. 29, no. 14, pp. 1803–1811, May 2011, doi: 10.1200/JCO.2010.33.3252.
- [22] A. L. Shaffer, A. Rosenwald, and L. M. Staudt, “Lymphoid malignancies: the dark side of B-cell differentiation,” *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 2, no. 12, pp. 920–932, Dec. 2002, doi: 10.1038/nri953.
- [23] K. Pieper, B. Grimbacher, and H. Eibel, “B-cell biology and development,” *J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 131, no. 4, pp. 959–971, Apr. 2013, doi: 10.1016/j.jaci.2013.01.046.
- [24] R. Küppers, “Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis,” *Nat. Rev. Cancer*, vol. 5, no. 4, pp. 251–262, Apr. 2005, doi: 10.1038/nrc1589.
- [25] S. SH *et al.*, *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*.
.
- [26] M. Jiang, N. N. Bennani, and A. L. Feldman, “Lymphoma classification update: B-cell non-Hodgkin lymphomas,” *Expert Rev. Hematol.*, vol. 10, no. 5, pp. 405–415, 2017, doi: 10.1080/17474086.2017.1318053.
- [27] M. Jiang, N. N. Bennani, and A. L. Feldman, “Lymphoma classification update: T-cell lymphomas, Hodgkin lymphomas, and histiocytic/dendritic cell neoplasms,” *Expert Rev. Hematol.*, vol. 10, no. 3, pp. 239–249, Mar. 2017, doi: 10.1080/17474086.2017.1281122.
- [28] E. S. Jaffe, “Diagnosis and classification of lymphoma: Impact of technical advances,” *Semin. Hematol.*, vol. 56, no. 1, pp. 30–36, 2019, doi: 10.1053/j.seminhematol.2018.05.007.
- [29] F. Cucco *et al.*, “Distinct genetic changes reveal evolutionary history and heterogeneous molecular grade of DLBCL with MYC/BCL2 double-hit,” *Leukemia*, Dec. 2019, doi: 10.1038/s41375-019-0691-6.

- [30] P. P. Carbone, H. S. Kaplan, K. Musshoff, D. W. Smithers, and M. Tubiana, "Report of the Committee on Hodgkin's Disease Staging Classification," *Cancer Res.*, vol. 31, no. 11, pp. 1860–1861, Nov. 1971.
- [31] D. L. Sweet and J. E. Ultmann, "Chemotherapy of non-Hodgkin lymphoma: the diffuse types," *Antibiot. Chemother.*, vol. 24, pp. 125–133, 1978, doi: 10.1159/000401508.
- [32] W. D. Lewis, S. Lilly, and K. L. Jones, "Lymphoma: Diagnosis and Treatment," *Am. Fam. Physician*, vol. 101, no. 1, pp. 34–41, Jan. 2020.
- [33] A. Kumar, S. Sundararajan, S. Puvvada, and D. O. Persky, "Limited Stage Aggressive Non-Hodgkin Lymphoma: What Is Optimal Therapy?," *Curr. Treat. Options Oncol.*, vol. 17, no. 9, p. 45, 2016, doi: 10.1007/s11864-016-0424-2.
- [34] D. E. Gerber, "Targeted therapies: a new generation of cancer treatments," *Am. Fam. Physician*, vol. 77, no. 3, pp. 311–319, Feb. 2008.
- [35] A. Rosenthal, "Small Molecule Inhibitors in Chronic Lymphocytic Lymphoma and B Cell Non-Hodgkin Lymphoma," *Curr. Hematol. Malig. Rep.*, vol. 12, no. 3, pp. 207–216, 2017, doi: 10.1007/s11899-017-0383-0.
- [36] T. Siddiqi and S. T. Rosen, "Novel biologic agents for non-Hodgkin lymphoma and chronic lymphocytic leukemia-part 2: adoptive cellular immunotherapy, small-molecule inhibitors, and immunomodulation," *Oncol. Williston Park N*, vol. 29, no. 4, pp. 299–308, Apr. 2015.
- [37] A. Aalipour and R. H. Advani, "Bruton's tyrosine kinase inhibitors and their clinical potential in the treatment of B-cell malignancies: focus on ibrutinib," *Ther. Adv. Hematol.*, vol. 5, no. 4, pp. 121–133, Aug. 2014, doi: 10.1177/2040620714539906.
- [38] O. J. D'Cruz and F. M. Uckun, "Protein kinase inhibitors against malignant lymphoma," *Expert Opin. Pharmacother.*, vol. 14, no. 6, pp. 707–721, Apr. 2013, doi: 10.1517/14656566.2013.780031.
- [39] M. F. M. de Rooij *et al.*, "The clinically active BTK inhibitor PCI-32765 targets B-cell receptor- and chemokine-controlled adhesion and migration in chronic lymphocytic leukemia," *Blood*, vol. 119, no. 11, pp. 2590–2594, Mar. 2012, doi: 10.1182/blood-2011-11-390989.
- [40] S. Cheng *et al.*, "BTK inhibition targets in vivo CLL proliferation through its effects on B-cell receptor signaling activity," *Leukemia*, vol. 28, no. 3, pp. 649–657, Mar. 2014, doi: 10.1038/leu.2013.358.
- [41] S. E. M. Herman *et al.*, "Bruton tyrosine kinase represents a promising therapeutic target for treatment of chronic lymphocytic leukemia and is effectively targeted by PCI-32765," *Blood*, vol. 117, no. 23, pp. 6287–6296, Jun. 2011, doi: 10.1182/blood-2011-01-328484.
- [42] C. Liang *et al.*, "The development of Bruton's tyrosine kinase (BTK) inhibitors from 2012 to 2017: A mini-review," *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 151, pp. 315–326, May 2018, doi: 10.1016/j.ejmech.2018.03.062.
- [43] A. Psyrris *et al.*, "Phosphatidylinositol 3'-kinase catalytic subunit alpha gene amplification contributes to the pathogenesis of mantle cell lymphoma," *Clin. Cancer Res. Off.*

J. Am. Assoc. Cancer Res., vol. 15, no. 18, pp. 5724–5732, Sep. 2009, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-3215.

[44] O. I. Yahiaoui *et al.*, “Constitutive AKT activation in follicular lymphoma,” *BMC Cancer*, vol. 14, p. 565, Aug. 2014, doi: 10.1186/1471-2407-14-565.

[45] S. Dinner and L. C. Plataniias, “Targeting the mTOR Pathway in Leukemia,” *J. Cell. Biochem.*, vol. 117, no. 8, pp. 1745–1752, 2016, doi: 10.1002/jcb.25559.

[46] D. Yu *et al.*, “Targeting the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway by pterostilbene attenuates mantle cell lymphoma progression,” *Acta Biochim. Biophys. Sin.*, vol. 50, no. 8, pp. 782–792, Aug. 2018, doi: 10.1093/abbs/gmy070.

[47] N. Vogt, B. Dai, T. Erdmann, W. E. Berdel, and G. Lenz, “The molecular pathogenesis of mantle cell lymphoma,” *Leuk. Lymphoma*, vol. 58, no. 7, pp. 1530–1537, 2017, doi: 10.1080/10428194.2016.1248965.

[48] H. Guo *et al.*, “Dual inhibition of PI3K signaling and histone deacetylation halts proliferation and induces lethality in mantle cell lymphoma,” *Oncogene*, vol. 38, no. 11, pp. 1802–1814, 2019, doi: 10.1038/s41388-018-0550-3.

[49] B. J. Lannutti *et al.*, “CAL-101, a p110delta selective phosphatidylinositol-3-kinase inhibitor for the treatment of B-cell malignancies, inhibits PI3K signaling and cellular viability,” *Blood*, vol. 117, no. 2, pp. 591–594, Jan. 2011, doi: 10.1182/blood-2010-03-275305.

[50] J. R. Brown *et al.*, “Idelalisib, an inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase p110 δ , for relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia,” *Blood*, vol. 123, no. 22, pp. 3390–3397, May 2014, doi: 10.1182/blood-2013-11-535047.

[51] I. de Weerd, S. M. Koopmans, A. P. Kater, and M. van Gelder, “Incidence and management of toxicity associated with ibrutinib and idelalisib: a practical approach,” *Haematologica*, vol. 102, no. 10, p. 1629, Oct. 2017, doi: 10.3324/haematol.2017.164103.

[52] I. W. Flinn *et al.*, “Duvelisib, a novel oral dual inhibitor of PI3K- δ,γ , is clinically active in advanced hematologic malignancies,” *Blood*, vol. 131, no. 8, pp. 877–887, 22 2018, doi: 10.1182/blood-2017-05-786566.

[53] A. Markham, “Copanlisib: First Global Approval,” *Drugs*, vol. 77, no. 18, pp. 2057–2062, Dec. 2017, doi: 10.1007/s40265-017-0838-6.

[54] B. K. Sasi *et al.*, “Inhibition of SYK or BTK augments venetoclax sensitivity in SHP1-negative/BCL-2-positive diffuse large B-cell lymphoma,” *Leukemia*, vol. 33, no. 10, pp. 2416–2428, Oct. 2019, doi: 10.1038/s41375-019-0442-8.

[55] G. Mutzbauer *et al.*, “SYK expression in monomorphic epitheliotropic intestinal T-cell lymphoma,” *Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc.*, vol. 31, no. 3, pp. 505–516, 2018, doi: 10.1038/modpathol.2017.145.

[56] L. Leseux *et al.*, “Syk-dependent mTOR activation in follicular lymphoma cells,” *Blood*, vol. 108, no. 13, pp. 4156–4162, Dec. 2006, doi: 10.1182/blood-2006-05-026203.

- [57] F. Llambi *et al.*, “A unified model of mammalian BCL-2 protein family interactions at the mitochondria,” *Mol. Cell*, vol. 44, no. 4, pp. 517–531, Nov. 2011, doi: 10.1016/j.molcel.2011.10.001.
- [58] S. Li, P. Lin, and L. J. Medeiros, “Advances in pathological understanding of high-grade B cell lymphomas,” *Expert Rev. Hematol.*, vol. 11, no. 8, pp. 637–648, 2018, doi: 10.1080/17474086.2018.1494567.
- [59] W. Yin *et al.*, “The impact of BCL-2/MYC protein expression and gene abnormality on primary central nervous system diffuse large B-cell lymphoma,” *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, vol. 12, no. 6, pp. 2215–2223, 2019.
- [60] M. C. Wei *et al.*, “Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death,” *Science*, vol. 292, no. 5517, pp. 727–730, Apr. 2001, doi: 10.1126/science.1059108.
- [61] M.-S. Tsai, M.-S. Hsieh, H.-Y. Huang, and P.-H. Huang, “Nuclear immunoreactivity of BLM-s, a proapoptotic BCL-2 family member, is specifically detected in salivary adenoid cystic carcinoma,” *Hum. Pathol.*, vol. 84, pp. 81–91, 2019, doi: 10.1016/j.humpath.2018.09.005.
- [62] M. Giam, T. Okamoto, J. D. Mintern, A. Strasser, and P. Bouillet, “Bcl-2 family member Bcl-G is not a proapoptotic protein,” *Cell Death Dis.*, vol. 3, p. e404, Oct. 2012, doi: 10.1038/cddis.2012.130.
- [63] C. Bodur and H. Basaga, “Bcl-2 inhibitors: emerging drugs in cancer therapy,” *Curr. Med. Chem.*, vol. 19, no. 12, pp. 1804–1820, 2012, doi: 10.2174/092986712800099839.
- [64] L. M. Lindqvist, M. Heinlein, D. C. S. Huang, and D. L. Vaux, “Prosurvival Bcl-2 family members affect autophagy only indirectly, by inhibiting Bax and Bak,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 111, no. 23, pp. 8512–8517, Jun. 2014, doi: 10.1073/pnas.1406425111.
- [65] H. M. Shallal, J. S. Faridi, and W. A. Russu, “Anti-tumor pyrimidinylpiperazines bind to the prosurvival Bcl-2 protein family member Bcl-XL,” *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 21, no. 5, pp. 1325–1328, Mar. 2011, doi: 10.1016/j.bmcl.2011.01.054.
- [66] A. J. Souers *et al.*, “ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets,” *Nat. Med.*, vol. 19, no. 2, pp. 202–208, Feb. 2013, doi: 10.1038/nm.3048.
- [67] Y. Wang *et al.*, “ABT-199-mediated inhibition of Bcl-2 as a potential therapeutic strategy for nasopharyngeal carcinoma,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 503, no. 3, pp. 1214–1220, 10 2018, doi: 10.1016/j.bbrc.2018.07.027.
- [68] Z. Mitrović and I. Aurer, “[Rituximab in the treatment of B-cell non-Hodgkin lymphoma],” *Lijec. Vjesn.*, vol. 128, no. 1–2, pp. 36–42, Feb. 2006.
- [69] B. Collins-Burow and E. S. Santos, “Rituximab and its role as maintenance therapy in non-Hodgkin lymphoma,” *Expert Rev. Anticancer Ther.*, vol. 7, no. 3, pp. 257–273, Mar. 2007, doi: 10.1586/14737140.7.3.257.

- [70] P. Feugier, “A review of rituximab, the first anti-CD20 monoclonal antibody used in the treatment of B non-Hodgkin’s lymphomas,” *Future Oncol. Lond. Engl.*, vol. 11, no. 9, pp. 1327–1342, 2015, doi: 10.2217/fon.15.57.
- [71] S. Cang, N. Mukhi, K. Wang, and D. Liu, “Novel CD20 monoclonal antibodies for lymphoma therapy,” *J. Hematol. Oncol. J Hematol Oncol*, vol. 5, p. 64, Oct. 2012, doi: 10.1186/1756-8722-5-64.
- [72] H. Jacene *et al.*, “Initial Experience with Tositumomab and I-131-Labeled Tositumomab for Treatment of Relapsed/Refractory Hodgkin Lymphoma,” *Mol. Imaging Biol.*, vol. 19, no. 3, pp. 429–436, 2017, doi: 10.1007/s11307-016-1019-9.
- [73] D. Liu and J. Zhao, “Frontline therapies for untreated chronic lymphoid leukemia,” *Exp. Hematol. Oncol.*, vol. 8, p. 15, 2019, doi: 10.1186/s40164-019-0139-8.
- [74] E. U. Spukti *et al.*, “⁹⁰Y-ibritumomab-tiuxetan as a therapeutic alternative for follicular lymphoma (FL): A single-center experience,” *Eur. J. Haematol.*, vol. 101, no. 4, pp. 514–521, Oct. 2018, doi: 10.1111/ejh.13138.
- [75] C. Luan and B. Chen, “Clinical application of obinutuzumab for treating chronic lymphocytic leukemia,” *Drug Des. Devel. Ther.*, vol. 13, pp. 2899–2909, 2019, doi: 10.2147/DDDT.S212500.
- [76] F. W. Thielen *et al.*, “Obinutuzumab in Combination with Chemotherapy for the First-Line Treatment of Patients with Advanced Follicular Lymphoma : An Evidence Review Group Evaluation of the NICE Single Technology Appraisal,” *PharmacoEconomics*, vol. 37, no. 8, pp. 975–984, 2019, doi: 10.1007/s40273-018-0740-4.
- [77] S. H. Lim, S. A. Beers, R. R. French, P. W. M. Johnson, M. J. Glennie, and M. S. Cragg, “Anti-CD20 monoclonal antibodies: historical and future perspectives,” *Haematologica*, vol. 95, no. 1, pp. 135–143, Jan. 2010, doi: 10.3324/haematol.2008.001628.
- [78] R. R. Furman, M. Coleman, and J. P. Leonard, “Epratuzumab in non-Hodgkin’s lymphomas,” *Curr. Treat. Options Oncol.*, vol. 5, no. 4, pp. 283–288, Aug. 2004, doi: 10.1007/s11864-004-0019-1.
- [79] N. I. Pathan, P. Chu, K. Hariharan, C. Cheney, A. Molina, and J. Byrd, “Mediation of apoptosis by and antitumor activity of lumiliximab in chronic lymphocytic leukemia cells and CD23+ lymphoma cell lines,” *Blood*, vol. 111, no. 3, pp. 1594–1602, Feb. 2008, doi: 10.1182/blood-2007-03-082024.
- [80] A. Anastasia and G. Rossi, “Novel Drugs in Follicular Lymphoma,” *Mediterr. J. Hematol. Infect. Dis.*, vol. 8, no. 1, p. e2016061, 2016, doi: 10.4084/MJHID.2016.061.
- [81] J. P. Leonard *et al.*, “A phase I/II study of galiximab (an anti-CD80 monoclonal antibody) in combination with rituximab for relapsed or refractory, follicular lymphoma,” *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.*, vol. 18, no. 7, pp. 1216–1223, Jul. 2007, doi: 10.1093/annonc/mdm114.

- [82] H. Kiyoi *et al.*, “Phase 1b/2 Study of Blinatumomab in Japanese Adults With Relapsed/Refractory Acute Lymphoblastic Leukemia,” *Cancer Sci.*, Jan. 2020, doi: 10.1111/cas.14322.
- [83] J. Zhao, Y. Song, and D. Liu, “Recent advances on blinatumomab for acute lymphoblastic leukemia,” *Exp. Hematol. Oncol.*, vol. 8, p. 28, 2019, doi: 10.1186/s40164-019-0152-y.
- [84] H. Kantarjian, E. Jabbour, and M. S. Topp, “Blinatumomab for Acute Lymphoblastic Leukemia,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 376, no. 23, p. e49, 08 2017, doi: 10.1056/NEJMc1704012.
- [85] J. Mori, K. Oshima, and T. Tanimoto, “Blinatumomab for Acute Lymphoblastic Leukemia,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 376, no. 23, p. e49, 08 2017, doi: 10.1056/NEJMc1704012.
- [86] A. Bukhari and S. T. Lee, “Blinatumomab: a novel therapy for the treatment of non-Hodgkin’s lymphoma,” *Expert Rev. Hematol.*, vol. 12, no. 11, pp. 909–918, Nov. 2019, doi: 10.1080/17474086.2019.1676717.
- [87] R. Van Dijck *et al.*, “Blinatumomab in relapsed/refractory diffuse large B cell lymphoma,” *Ann. Hematol.*, vol. 96, no. 10, pp. 1759–1762, Oct. 2017, doi: 10.1007/s00277-017-3088-5.
- [88] L. J. Bryan and L. I. Gordon, “Pidilizumab in the treatment of diffuse large B-cell lymphoma,” *Expert Opin. Biol. Ther.*, vol. 14, no. 9, pp. 1361–1368, Sep. 2014, doi: 10.1517/14712598.2014.942637.
- [89] P. Armand *et al.*, “Disabling immune tolerance by programmed death-1 blockade with pidilizumab after autologous hematopoietic stem-cell transplantation for diffuse large B-cell lymphoma: results of an international phase II trial,” *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.*, vol. 31, no. 33, pp. 4199–4206, Nov. 2013, doi: 10.1200/JCO.2012.48.3685.
- [90] S. M. Ansell *et al.*, “PD-1 blockade with nivolumab in relapsed or refractory Hodgkin’s lymphoma,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 372, no. 4, pp. 311–319, Jan. 2015, doi: 10.1056/NEJMoa1411087.
- [91] H. C. Kluin-Nelemans *et al.*, “Treatment of older patients with mantle-cell lymphoma,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 367, no. 6, pp. 520–531, Aug. 2012, doi: 10.1056/NEJMoa1200920.
- [92] J. S. Pagano, “Interferon alfa and zidovudine in adult T-cell leukemia-lymphoma,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 333, no. 19, pp. 1285–1286, Nov. 1995.
- [93] P. S. Gill *et al.*, “Treatment of adult T-cell leukemia-lymphoma with a combination of interferon alfa and zidovudine,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 332, no. 26, pp. 1744–1748, Jun. 1995, doi: 10.1056/NEJM199506293322603.
- [94] P. Olioso, R. Giancola, M. Di Riti, A. Contento, P. Accorsi, and A. Iacone, “Immunotherapy with cytokine induced killer cells in solid and hematopoietic tumours: a pilot clinical trial,” *Hematol. Oncol.*, vol. 27, no. 3, pp. 130–139, Sep. 2009, doi: 10.1002/hon.886.
- [95] C. Lapenta *et al.*, “NK Cell Activation in the Antitumor Response Induced by IFN- α Dendritic Cells Loaded with Apoptotic Cells from Follicular Lymphoma Patients,” *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 197, no. 3, pp. 795–806, 01 2016, doi: 10.4049/jimmunol.1600262.

- [96] T.-H. Huang, K. R. Chintalacheruvu, and S. L. Morrison, "Targeting IFN- α to B cell lymphoma by a tumor-specific antibody elicits potent antitumor activities," *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 179, no. 10, pp. 6881–6888, Nov. 2007, doi: 10.4049/jimmunol.179.10.6881.
- [97] Y. Yang *et al.*, "Exploiting synthetic lethality for the therapy of ABC diffuse large B cell lymphoma," *Cancer Cell*, vol. 21, no. 6, pp. 723–737, Jun. 2012, doi: 10.1016/j.ccr.2012.05.024.
- [98] L. Zhang, Y.-T. Tai, M. Z. G. Ho, L. Qiu, and K. C. Anderson, "Interferon- α -based immunotherapies in the treatment of B cell-derived hematologic neoplasms in today's treat-to-target era," *Exp. Hematol. Oncol.*, vol. 6, p. 20, 2017, doi: 10.1186/s40164-017-0081-6.
- [99] T. I. Jensen, E. Axelgaard, and R. O. Bak, "Therapeutic gene editing in haematological disorders with CRISPR/Cas9," *Br. J. Haematol.*, vol. 185, no. 5, pp. 821–835, Jun. 2019, doi: 10.1111/bjh.15851.
- [100] S. Srivastava and S. R. Riddell, "Engineering CAR-T cells: Design concepts," *Trends Immunol.*, vol. 36, no. 8, pp. 494–502, Aug. 2015, doi: 10.1016/j.it.2015.06.004.
- [101] D. L. Porter, B. L. Levine, M. Kalos, A. Bagg, and C. H. June, "Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia," *N. Engl. J. Med.*, vol. 365, no. 8, pp. 725–733, Aug. 2011, doi: 10.1056/NEJMoa1103849.
- [102] C. H. June and M. Sadelain, "Chimeric Antigen Receptor Therapy," *N. Engl. J. Med.*, vol. 379, no. 1, pp. 64–73, 05 2018, doi: 10.1056/NEJMra1706169.
- [103] C. H. June, S. R. Riddell, and T. N. Schumacher, "Adoptive cellular therapy: a race to the finish line," *Sci. Transl. Med.*, vol. 7, no. 280, p. 280ps7, Mar. 2015, doi: 10.1126/scitranslmed.aaa3643.
- [104] S. S. Neelapu *et al.*, "Axicabtagene Ciloleucel CAR T-Cell Therapy in Refractory Large B-Cell Lymphoma," *N. Engl. J. Med.*, vol. 377, no. 26, pp. 2531–2544, 28 2017, doi: 10.1056/NEJMoa1707447.
- [105] P. Tiberghien, E. Deconinck, and O. Adotevi, "More on Anti-CD19 CAR T Cells in CNS Diffuse Large-B-Cell Lymphoma," *N. Engl. J. Med.*, vol. 377, no. 21, pp. 2101–2102, 23 2017, doi: 10.1056/NEJMc1712460.
- [106] J. S. Abramson and Y.-B. Chen, "More on Anti-CD19 CAR T Cells in CNS Diffuse Large-B-Cell Lymphoma," *N. Engl. J. Med.*, vol. 377, no. 21, p. 2102, 23 2017, doi: 10.1056/NEJMc1712460.
- [107] J. N. Kochenderfer and S. A. Rosenberg, "Treating B-cell cancer with T cells expressing anti-CD19 chimeric antigen receptors," *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, vol. 10, no. 5, pp. 267–276, May 2013, doi: 10.1038/nrclinonc.2013.46.
- [108] J. N. Kochenderfer *et al.*, "Eradication of B-lineage cells and regression of lymphoma in a patient treated with autologous T cells genetically engineered to recognize CD19," *Blood*, vol. 116, no. 20, pp. 4099–4102, Nov. 2010, doi: 10.1182/blood-2010-04-281931.

- [109] H. Qin *et al.*, “Eradication of B-ALL using chimeric antigen receptor-expressing T cells targeting the TSLPR oncoprotein,” *Blood*, vol. 126, no. 5, pp. 629–639, Jul. 2015, doi: 10.1182/blood-2014-11-612903.
- [110] M. S. Raab, K. Podar, I. Breitkreutz, P. G. Richardson, and K. C. Anderson, “Multiple myeloma,” *The Lancet*, vol. 374, no. 9686, pp. 324–339, Jul. 2009, doi: 10.1016/S0140-6736(09)60221-X.
- [111] N. W. C. J. van de Donk, T. Mutis, P. J. Poddighe, H. M. Lokhorst, and S. Zweegman, “Diagnosis, risk stratification and management of monoclonal gammopathy of undetermined significance and smoldering multiple myeloma,” *Int. J. Lab. Hematol.*, vol. 38, no. S1, pp. 110–122, 2016, doi: 10.1111/ijlh.12504.
- [112] “Myeloma - Cancer Stat Facts,” *SEER*. <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/mulmy.html> (accessed Jan. 17, 2020).
- [113] GBD 2015 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators, “Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 310 diseases and injuries, 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015,” *Lancet Lond. Engl.*, vol. 388, no. 10053, pp. 1545–1602, 08 2016, doi: 10.1016/S0140-6736(16)31678-6.
- [114] GBD 2015 Mortality and Causes of Death Collaborators, “Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015,” *Lancet Lond. Engl.*, vol. 388, no. 10053, pp. 1459–1544, Oct. 2016, doi: 10.1016/S0140-6736(16)31012-1.
- [115] R. A. Cartwright, K. A. Gurney, and A. V. Moorman, “Sex ratios and the risks of haematological malignancies,” *Br. J. Haematol.*, vol. 118, no. 4, pp. 1071–1077, 2002, doi: 10.1046/j.1365-2141.2002.03750.x.
- [116] “Plasma Cell Neoplasms (Including Multiple Myeloma)—Patient Version,” *National Cancer Institute*. <https://www.cancer.gov/types/myeloma> (accessed Jan. 17, 2020).
- [117] R. Bataille *et al.*, “Mechanisms of bone destruction in multiple myeloma: the importance of an unbalanced process in determining the severity of lytic bone disease,” *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.*, vol. 7, no. 12, pp. 1909–1914, Dec. 1989, doi: 10.1200/JCO.1989.7.12.1909.
- [118] R. Bataille *et al.*, “Osteoblast stimulation in multiple myeloma lacking lytic bone lesions,” *Br. J. Haematol.*, vol. 76, no. 4, pp. 484–487, Dec. 1990, doi: 10.1111/j.1365-2141.1990.tb07904.x.
- [119] A. Boyde, E. Maconnachie, S. A. Reid, G. Delling, and G. R. Mundy, “Scanning electron microscopy in bone pathology: review of methods, potential and applications,” *Scan. Electron Microsc.*, no. Pt 4, pp. 1537–1554, 1986.
- [120] G. D. Roodman, “Biology of osteoclast activation in cancer,” *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.*, vol. 19, no. 15, pp. 3562–3571, Aug. 2001, doi: 10.1200/JCO.2001.19.15.3562.

- [121] J. Pfeilschifter, C. Chenu, A. Bird, G. R. Mundy, and G. D. Roodman, "Interleukin-1 and tumor necrosis factor stimulate the formation of human osteoclastlike cells in vitro," *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.*, vol. 4, no. 1, pp. 113–118, Feb. 1989, doi: 10.1002/jbmr.5650040116.
- [122] W.-C. Cheung and B. Van Ness, "Distinct IL-6 signal transduction leads to growth arrest and death in B cells or growth promotion and cell survival in myeloma cells," *Leukemia*, vol. 16, no. 6, pp. 1182–1188, Jun. 2002, doi: 10.1038/sj.leu.2402481.
- [123] M. Abe *et al.*, "Role for macrophage inflammatory protein (MIP)-1alpha and MIP-1beta in the development of osteolytic lesions in multiple myeloma," *Blood*, vol. 100, no. 6, pp. 2195–2202, Sep. 2002.
- [124] K. Fuller, J. M. Owens, and T. J. Chambers, "Macrophage inflammatory protein-1 alpha and IL-8 stimulate the motility but suppress the resorption of isolated rat osteoclasts," *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 154, no. 11, pp. 6065–6072, Jun. 1995.
- [125] T. Kukita *et al.*, "Macrophage inflammatory protein-1 alpha (LD78) expressed in human bone marrow: its role in regulation of hematopoiesis and osteoclast recruitment," *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.*, vol. 76, no. 3, pp. 399–406, Mar. 1997.
- [126] F. Silvestris, P. Cafforio, N. Calvani, and F. Dammacco, "Impaired osteoblastogenesis in myeloma bone disease: role of upregulated apoptosis by cytokines and malignant plasma cells," *Br. J. Haematol.*, vol. 126, no. 4, pp. 475–486, Aug. 2004, doi: 10.1111/j.1365-2141.2004.05084.x.
- [127] C. E. Evans, C. S. Galasko, and C. Ward, "Does myeloma secrete an osteoblast inhibiting factor?," *J. Bone Joint Surg. Br.*, vol. 71, no. 2, pp. 288–290, Mar. 1989.
- [128] J. J. Westendorf, R. A. Kahler, and T. M. Schroeder, "Wnt signaling in osteoblasts and bone diseases," *Gene*, vol. 341, pp. 19–39, Oct. 2004, doi: 10.1016/j.gene.2004.06.044.
- [129] G. Bain, T. Müller, X. Wang, and J. Papkoff, "Activated beta-catenin induces osteoblast differentiation of C3H10T1/2 cells and participates in BMP2 mediated signal transduction," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 301, no. 1, pp. 84–91, Jan. 2003, doi: 10.1016/s0006-291x(02)02951-0.
- [130] E. Tian *et al.*, "The role of the Wnt-signaling antagonist DKK1 in the development of osteolytic lesions in multiple myeloma," *N. Engl. J. Med.*, vol. 349, no. 26, pp. 2483–2494, Dec. 2003, doi: 10.1056/NEJMoa030847.
- [131] L. A. Ehrlich *et al.*, "IL-3 is a potential inhibitor of osteoblast differentiation in multiple myeloma," *Blood*, vol. 106, no. 4, pp. 1407–1414, Aug. 2005, doi: 10.1182/blood-2005-03-1080.
- [132] N. Giuliani *et al.*, "Myeloma cells block RUNX2/CBFA1 activity in human bone marrow osteoblast progenitors and inhibit osteoblast formation and differentiation," *Blood*, vol. 106, no. 7, pp. 2472–2483, Oct. 2005, doi: 10.1182/blood-2004-12-4986.
- [133] G. Vignon *et al.*, "A new case of IgE multiple myeloma with review of literature," *Ann. Biol. Clin. (Paris)*, vol. 75, no. 4, pp. 442–444, Aug. 2017, doi: 10.1684/abc.2017.1263.

- [134] S. Chhabra *et al.*, “IgM Myeloma with Plasma Cell Leukemia: Case Report and Literature Review,” *Ann. Clin. Lab. Sci.*, vol. 47, no. 5, pp. 611–619, Sep. 2017.
- [135] S. Pandey and R. A. Kyle, “Unusual myelomas: a review of IgD and IgE variants,” *Oncol. Williston Park N*, vol. 27, no. 8, pp. 798–803, Aug. 2013.
- [136] S. Lonial and J. L. Kaufman, “Non-secretory myeloma: a clinician’s guide,” *Oncol. Williston Park N*, vol. 27, no. 9, pp. 924–928, 930, Sep. 2013.
- [137] V. Batuman, “The pathogenesis of acute kidney impairment in patients with multiple myeloma,” *Adv. Chronic Kidney Dis.*, vol. 19, no. 5, pp. 282–286, Sep. 2012, doi: 10.1053/j.ackd.2012.04.009.
- [138] International Myeloma Working Group, “Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group,” *Br. J. Haematol.*, vol. 121, no. 5, pp. 749–757, Jun. 2003.
- [139] P. Sonneveld *et al.*, “Treatment of multiple myeloma with high-risk cytogenetics: a consensus of the International Myeloma Working Group,” *Blood*, vol. 127, no. 24, pp. 2955–2962, 16 2016, doi: 10.1182/blood-2016-01-631200.
- [140] R. A. Kyle and S. V. Rajkumar, “Treatment of multiple myeloma: a comprehensive review,” *Clin. Lymphoma Myeloma*, vol. 9, no. 4, pp. 278–288, Aug. 2009, doi: 10.3816/CLM.2009.n.056.
- [141] P. R. Greipp *et al.*, “International staging system for multiple myeloma,” *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.*, vol. 23, no. 15, pp. 3412–3420, May 2005, doi: 10.1200/JCO.2005.04.242.
- [142] P. Moreau, M. Attal, and T. Facon, “Frontline therapy of multiple myeloma,” *Blood*, vol. 125, no. 20, pp. 3076–3084, May 2015, doi: 10.1182/blood-2014-09-568915.
- [143] K. A. Cronin *et al.*, “Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, part I: National cancer statistics,” *Cancer*, vol. 124, no. 13, pp. 2785–2800, 2018, doi: 10.1002/cncr.31551.
- [144] H. Tamura, M. Ishibashi, M. Sunakawa, and K. Inokuchi, “Immunotherapy for Multiple Myeloma,” *Cancers*, vol. 11, no. 12, Dec. 2019, doi: 10.3390/cancers11122009.
- [145] F. Pojero, P. Poma, V. Spanò, A. Montalbano, P. Barraja, and M. Notarbartolo, “Targeting multiple myeloma with natural polyphenols,” *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 180, pp. 465–485, Oct. 2019, doi: 10.1016/j.ejmech.2019.07.041.
- [146] H. Nagoshi, K. Ide, and H. Suzuki, “[Radiotherapy for myeloma],” *Nihon Rinsho Jpn. J. Clin. Med.*, vol. 53, no. 3, pp. 653–657, Mar. 1995.
- [147] R. Mhaskar, A. Kumar, B. Miladinovic, and B. Djulbegovic, “Bisphosphonates in multiple myeloma: an updated network meta-analysis,” *Cochrane Database Syst. Rev.*, vol. 12, p. CD003188, 18 2017, doi: 10.1002/14651858.CD003188.pub4.

- [148] G. Gahrton *et al.*, “Allogeneic bone marrow transplantation in multiple myeloma. European Group for Bone Marrow Transplantation,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 325, no. 18, pp. 1267–1273, Oct. 1991, doi: 10.1056/NEJM199110313251802.
- [149] B. Barlogie, L. Smith, and R. Alexanian, “Effective treatment of advanced multiple myeloma refractory to alkylating agents,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 310, no. 21, pp. 1353–1356, May 1984, doi: 10.1056/NEJM198405243102104.
- [150] M. Attal *et al.*, “A prospective, randomized trial of autologous bone marrow transplantation and chemotherapy in multiple myeloma. Intergroupe Français du Myélome,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 335, no. 2, pp. 91–97, Jul. 1996, doi: 10.1056/NEJM199607113350204.
- [151] P. Moreau *et al.*, “Comparison of 200 mg/m² melphalan and 8 Gy total body irradiation plus 140 mg/m² melphalan as conditioning regimens for peripheral blood stem cell transplantation in patients with newly diagnosed multiple myeloma: final analysis of the Intergroupe Francophone du Myélome 9502 randomized trial,” *Blood*, vol. 99, no. 3, pp. 731–735, Feb. 2002, doi: 10.1182/blood.v99.3.731.
- [152] M. Attal *et al.*, “Single versus double autologous stem-cell transplantation for multiple myeloma,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 349, no. 26, pp. 2495–2502, Dec. 2003, doi: 10.1056/NEJMoa032290.
- [153] S. A. Holstein and P. L. McCarthy, “Immunomodulatory Drugs in Multiple Myeloma: Mechanisms of Action and Clinical Experience,” *Drugs*, vol. 77, no. 5, pp. 505–520, Apr. 2017, doi: 10.1007/s40265-017-0689-1.
- [154] H. Quach *et al.*, “Mechanism of action of immunomodulatory drugs (IMiDS) in multiple myeloma,” *Leukemia*, vol. 24, no. 1, pp. 22–32, Jan. 2010, doi: 10.1038/leu.2009.236.
- [155] F. E. Davies *et al.*, “Thalidomide and immunomodulatory derivatives augment natural killer cell cytotoxicity in multiple myeloma,” *Blood*, vol. 98, no. 1, pp. 210–216, Jul. 2001, doi: 10.1182/blood.v98.1.210.
- [156] K. Luptakova *et al.*, “Lenalidomide enhances anti-myeloma cellular immunity,” *Cancer Immunol. Immunother. CII*, vol. 62, no. 1, pp. 39–49, Jan. 2013, doi: 10.1007/s00262-012-1308-3.
- [157] G. Görgün *et al.*, “Lenalidomide Enhances Immune Checkpoint Blockade-Induced Immune Response in Multiple Myeloma,” *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.*, vol. 21, no. 20, pp. 4607–4618, Oct. 2015, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-0200.
- [158] C. Galustian *et al.*, “The anti-cancer agents lenalidomide and pomalidomide inhibit the proliferation and function of T regulatory cells,” *Cancer Immunol. Immunother. CII*, vol. 58, no. 7, pp. 1033–1045, Jul. 2009, doi: 10.1007/s00262-008-0620-4.
- [159] K. Noonan *et al.*, “Lenalidomide-induced immunomodulation in multiple myeloma: impact on vaccines and antitumor responses,” *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.*, vol. 18, no. 5, pp. 1426–1434, Mar. 2012, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-1221.

- [160] A. Busch *et al.*, “Treatment with lenalidomide induces immunoactivating and counter-regulatory immunosuppressive changes in myeloma patients,” *Clin. Exp. Immunol.*, vol. 177, no. 2, pp. 439–453, Aug. 2014, doi: 10.1111/cei.12343.
- [161] R. A. Kyle *et al.*, “Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and smoldering (asymptomatic) multiple myeloma: IMWG consensus perspectives risk factors for progression and guidelines for monitoring and management,” *Leukemia*, vol. 24, no. 6, pp. 1121–1127, Jun. 2010, doi: 10.1038/leu.2010.60.
- [162] M.-V. Mateos *et al.*, “Lenalidomide plus dexamethasone for high-risk smoldering multiple myeloma,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 369, no. 5, pp. 438–447, Aug. 2013, doi: 10.1056/NEJMoa1300439.
- [163] A. K. Stewart, P. G. Richardson, and J. F. San-Miguel, “How I treat multiple myeloma in younger patients,” *Blood*, vol. 114, no. 27, pp. 5436–5443, Dec. 2009, doi: 10.1182/blood-2009-07-204651.
- [164] M. Ladetto *et al.*, “Major tumor shrinking and persistent molecular remissions after consolidation with bortezomib, thalidomide, and dexamethasone in patients with autografted myeloma,” *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.*, vol. 28, no. 12, pp. 2077–2084, Apr. 2010, doi: 10.1200/JCO.2009.23.7172.
- [165] J.-L. Harousseau, M. Attal, and H. Avet-Loiseau, “The role of complete response in multiple myeloma,” *Blood*, vol. 114, no. 15, pp. 3139–3146, Oct. 2009, doi: 10.1182/blood-2009-03-201053.
- [166] L. Benboubker *et al.*, “Lenalidomide and dexamethasone in transplant-ineligible patients with myeloma,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 371, no. 10, pp. 906–917, Sep. 2014, doi: 10.1056/NEJMoa1402551.
- [167] M. A. Dimopoulos *et al.*, “VMP (Bortezomib, Melphalan, and Prednisone) is active and well tolerated in newly diagnosed patients with multiple myeloma with moderately impaired renal function, and results in reversal of renal impairment: cohort analysis of the phase III VISTA study,” *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.*, vol. 27, no. 36, pp. 6086–6093, Dec. 2009, doi: 10.1200/JCO.2009.22.2232.
- [168] E. Eleutherakis-Papaiakovou, M. Gavriatopoulou, I. Ntanasis-Stathopoulos, E. Kastritis, E. Terpos, and M. A. Dimopoulos, “Elotuzumab in combination with pomalidomide and dexamethasone for the treatment of multiple myeloma,” *Expert Rev. Anticancer Ther.*, vol. 19, no. 11, pp. 921–928, Nov. 2019, doi: 10.1080/14737140.2019.1685879.
- [169] M. A. Dimopoulos *et al.*, “Daratumumab, Lenalidomide, and Dexamethasone for Multiple Myeloma,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 375, no. 14, pp. 1319–1331, 06 2016, doi: 10.1056/NEJMoa1607751.
- [170] J. P. Laubach, Y.-T. Tai, P. G. Richardson, and K. C. Anderson, “Daratumumab granted breakthrough drug status,” *Expert Opin. Investig. Drugs*, vol. 23, no. 4, pp. 445–452, Apr. 2014, doi: 10.1517/13543784.2014.889681.

- [171] H. M. Lokhorst *et al.*, “Targeting CD38 with Daratumumab Monotherapy in Multiple Myeloma,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 373, no. 13, pp. 1207–1219, Sep. 2015, doi: 10.1056/NEJMoa1506348.
- [172] M. Attal, P. G. Richardson, and P. Moreau, “Drug Combinations with Transplantation for Myeloma,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 377, no. 1, pp. 93–94, 06 2017, doi: 10.1056/NEJMc1705671.
- [173] S. Lonial *et al.*, “Elotuzumab in combination with lenalidomide and low-dose dexamethasone in relapsed or refractory multiple myeloma,” *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.*, vol. 30, no. 16, pp. 1953–1959, Jun. 2012, doi: 10.1200/JCO.2011.37.2649.
- [174] P. Moreau *et al.*, “Bortezomib, thalidomide, and dexamethasone with or without daratumumab before and after autologous stem-cell transplantation for newly diagnosed multiple myeloma (CASSIOPEIA): a randomised, open-label, phase 3 study,” *Lancet Lond. Engl.*, vol. 394, no. 10192, pp. 29–38, 06 2019, doi: 10.1016/S0140-6736(19)31240-1.
- [175] Y.-T. Tai *et al.*, “APRIL and BCMA promote human multiple myeloma growth and immunosuppression in the bone marrow microenvironment,” *Blood*, vol. 127, no. 25, pp. 3225–3236, 23 2016, doi: 10.1182/blood-2016-01-691162.
- [176] F. Oden *et al.*, “Potent anti-tumor response by targeting B cell maturation antigen (BCMA) in a mouse model of multiple myeloma,” *Mol. Oncol.*, vol. 9, no. 7, pp. 1348–1358, Aug. 2015, doi: 10.1016/j.molonc.2015.03.010.
- [177] L. Lee *et al.*, “Evaluation of B cell maturation antigen as a target for antibody drug conjugate mediated cytotoxicity in multiple myeloma,” *Br. J. Haematol.*, vol. 174, no. 6, pp. 911–922, 2016, doi: 10.1111/bjh.14145.
- [178] Y.-T. Tai *et al.*, “Novel anti-B-cell maturation antigen antibody-drug conjugate (GSK2857916) selectively induces killing of multiple myeloma,” *Blood*, vol. 123, no. 20, pp. 3128–3138, May 2014, doi: 10.1182/blood-2013-10-535088.
- [179] R. O. Carpenter *et al.*, “B-cell maturation antigen is a promising target for adoptive T-cell therapy of multiple myeloma,” *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.*, vol. 19, no. 8, pp. 2048–2060, Apr. 2013, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-2422.
- [180] S. A. Ali *et al.*, “T cells expressing an anti-B-cell maturation antigen chimeric antigen receptor cause remissions of multiple myeloma,” *Blood*, vol. 128, no. 13, pp. 1688–1700, 29 2016, doi: 10.1182/blood-2016-04-711903.
- [181] A. D. Cohen, “Myeloma: next generation immunotherapy,” *Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ. Program*, vol. 2019, no. 1, pp. 266–272, Dec. 2019, doi: 10.1182/hematology.2019000068.
- [182] N. Giuliani *et al.*, “Novel targets for the treatment of relapsing multiple myeloma,” *Expert Rev. Hematol.*, vol. 12, no. 7, pp. 481–496, Jul. 2019, doi: 10.1080/17474086.2019.1624158.

- [183] C. Touzeau, P. Maciag, M. Amiot, and P. Moreau, “Targeting Bcl-2 for the treatment of multiple myeloma,” *Leukemia*, vol. 32, no. 9, pp. 1899–1907, 2018, doi: 10.1038/s41375-018-0223-9.
- [184] A. Kotschy *et al.*, “The MCL1 inhibitor S63845 is tolerable and effective in diverse cancer models,” *Nature*, vol. 538, no. 7626, pp. 477–482, 27 2016, doi: 10.1038/nature19830.
- [185] C. S. Chim *et al.*, “Management of relapsed and refractory multiple myeloma: novel agents, antibodies, immunotherapies and beyond,” *Leukemia*, vol. 32, no. 2, pp. 252–262, 2018, doi: 10.1038/leu.2017.329.
- [186] O. Landgren and S. V. Rajkumar, “New Developments in Diagnosis, Prognosis, and Assessment of Response in Multiple Myeloma,” *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.*, vol. 22, no. 22, pp. 5428–5433, Nov. 2016, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-16-0866.
- [187] S. Kumar *et al.*, “International Myeloma Working Group consensus criteria for response and minimal residual disease assessment in multiple myeloma,” *Lancet Oncol.*, vol. 17, no. 8, pp. e328–e346, 2016, doi: 10.1016/S1470-2045(16)30206-6.
- [188] I. De Kouchkovsky and M. Abdul-Hay, “Acute myeloid leukemia: a comprehensive review and 2016 update,” *Blood Cancer J.*, vol. 6, no. 7, pp. e441–e441, Jul. 2016, doi: 10.1038/bcj.2016.50.
- [189] C. S. Grove and G. S. Vassiliou, “Acute myeloid leukaemia: a paradigm for the clonal evolution of cancer?,” *Dis. Model. Mech.*, vol. 7, no. 8, pp. 941–951, Aug. 2014, doi: 10.1242/dmm.015974.
- [190] B. Deschler and M. Lübbert, “Acute myeloid leukemia: Epidemiology and etiology,” *Cancer*, vol. 107, no. 9, pp. 2099–2107, 2006, doi: 10.1002/cncr.22233.
- [191] “SEER Cancer Statistics Review, 1975-2016,” *SEER*. https://seer.cancer.gov/csr/1975_2016/index.html (accessed Jan. 20, 2020).
- [192] L. S. G. Ostgård *et al.*, “Data quality in the Danish National Acute Leukemia Registry: a hematological data resource,” *Clin. Epidemiol.*, vol. 5, pp. 335–344, 2013, doi: 10.2147/CLEP.S48411.
- [193] M. A. Bekadja *et al.*, “A population-based study of the epidemiology and clinical features of adults with acute myeloid leukemia in Algeria: report on behalf of the Algerian Acute Leukemia Study Group,” *Hematol. Oncol. Stem Cell Ther.*, vol. 4, no. 4, pp. 161–166, Oct. 2011, doi: 10.5144/1658-3876.2011.161.
- [194] A. Smith, D. Howell, R. Patmore, A. Jack, and E. Roman, “Incidence of haematological malignancy by sub-type: a report from the Haematological Malignancy Research Network,” *Br. J. Cancer*, vol. 105, no. 11, pp. 1684–1692, Nov. 2011, doi: 10.1038/bjc.2011.450.
- [195] E. Estey and H. Döhner, “Acute myeloid leukaemia,” *Lancet Lond. Engl.*, vol. 368, no. 9550, pp. 1894–1907, Nov. 2006, doi: 10.1016/S0140-6736(06)69780-8.
- [196] “Acute Myeloid Leukemia - Cancer Stat Facts,” *SEER*. <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/amyl.html> (accessed Jan. 20, 2020).

- [197] R. L. Siegel, K. D. Miller, and A. Jemal, “Cancer statistics, 2019,” *CA. Cancer J. Clin.*, vol. 69, no. 1, pp. 7–34, 2019, doi: 10.3322/caac.21551.
- [198] M. Sant *et al.*, “Incidence of hematologic malignancies in Europe by morphologic subtype: results of the HAEMACARE project,” *Blood*, vol. 116, no. 19, pp. 3724–3734, Nov. 2010, doi: 10.1182/blood-2010-05-282632.
- [199] O. Visser *et al.*, “Incidence, survival and prevalence of myeloid malignancies in Europe,” *Eur. J. Cancer Oxf. Engl. 1990*, vol. 48, no. 17, pp. 3257–3266, Nov. 2012, doi: 10.1016/j.ejca.2012.05.024.
- [200] S. A. Parikh, E. Jabbour, and C. A. Koller, “Chapter 2. Adult Acute Myeloid Leukemia,” in *The MD Anderson Manual of Medical Oncology*, 2nd ed., H. M. Kantarjian, R. A. Wolff, and C. A. Koller, Eds. New York, NY: The McGraw-Hill Companies, 2011.
- [201] P. Desai, D. Hassane, and G. J. Roboz, “Clonal Hematopoiesis and risk of Acute Myeloid Leukemia,” *Best Pract. Res. Clin. Haematol.*, vol. 32, no. 2, pp. 177–185, 2019, doi: 10.1016/j.beha.2019.05.007.
- [202] A. Gao *et al.*, “Bone marrow endothelial cell-derived interleukin-4 contributes to thrombocytopenia in acute myeloid leukemia,” *Haematologica*, vol. 104, no. 10, pp. 1950–1961, Oct. 2019, doi: 10.3324/haematol.2018.214593.
- [203] “What Is Acute Myeloid Leukemia (AML)? | What Is AML?” <https://www.cancer.org/cancer/acute-myeloid-leukemia/about/what-is-aml.html> (accessed Jan. 26, 2020).
- [204] F. Ferrara and C. A. Schiffer, “Acute myeloid leukaemia in adults,” *Lancet Lond. Engl.*, vol. 381, no. 9865, pp. 484–495, Feb. 2013, doi: 10.1016/S0140-6736(12)61727-9.
- [205] J. L. Liesveld and M. A. Lichtman, “Chapter 89. Acute Myelogenous Leukemia,” in *Williams Hematology*, 8th ed., M. A. Lichtman, T. J. Kipps, U. Seligsohn, K. Kaushansky, and J. T. Prchal, Eds. New York, NY: The McGraw-Hill Companies, 2010.
- [206] J. J. Yang, T. S. Park, and T. S. K. Wan, “Recurrent Cytogenetic Abnormalities in Acute Myeloid Leukemia,” *Methods Mol. Biol. Clifton NJ*, vol. 1541, pp. 223–245, 2017, doi: 10.1007/978-1-4939-6703-2_19.
- [207] S. C. Meyer and R. L. Levine, “Translational implications of somatic genomics in acute myeloid leukaemia,” *Lancet Oncol.*, vol. 15, no. 9, pp. e382-394, Aug. 2014, doi: 10.1016/S1470-2045(14)70008-7.
- [208] K. Agrawal, L. Miles, N. Agrawal, and A. Khan, “Atypical Presentation of Acute Myeloid Leukemia,” *World J. Oncol.*, vol. 9, no. 1, pp. 29–34, Feb. 2018, doi: 10.14740/wjon1083w.
- [209] I. S. Dokal, T. M. Cox, and D. A. Galton, “Vitamin B-12 and folate deficiency presenting as leukaemia,” *BMJ*, vol. 300, no. 6734, pp. 1263–1264, May 1990, doi: 10.1136/bmj.300.6734.1263.

- [210] C. Aitelli, L. Wasson, and R. Page, “Pernicious anemia: presentations mimicking acute leukemia,” *South. Med. J.*, vol. 97, no. 3, pp. 295–297, Mar. 2004, doi: 10.1097/01.SMJ.0000082003.98003.88.
- [211] Z. Zuo, J. M. Polski, A. Kasyan, and L. J. Medeiros, “Acute erythroid leukemia,” *Arch. Pathol. Lab. Med.*, vol. 134, no. 9, pp. 1261–1270, Sep. 2010, doi: 10.1043/2009-0350-RA.1.
- [212] A. Barzi and M. A. Sekeres, “Myelodysplastic syndromes: a practical approach to diagnosis and treatment,” *Cleve. Clin. J. Med.*, vol. 77, no. 1, pp. 37–44, Jan. 2010, doi: 10.3949/ccjm.77a.09069.
- [213] C. D. Baldus, K. Mrózek, G. Marcucci, and C. D. Bloomfield, “Clinical outcome of de novo acute myeloid leukaemia patients with normal cytogenetics is affected by molecular genetic alterations: a concise review,” *Br. J. Haematol.*, vol. 137, no. 5, pp. 387–400, Jun. 2007, doi: 10.1111/j.1365-2141.2007.06566.x.
- [214] J. W. Vardiman, N. L. Harris, and R. D. Brunning, “The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms,” *Blood*, vol. 100, no. 7, pp. 2292–2302, Oct. 2002, doi: 10.1182/blood-2002-04-1199.
- [215] C. M. Segeren and M. B. van ’t Veer, “The FAB classification for acute myeloid leukaemia--is it outdated?,” *Neth. J. Med.*, vol. 49, no. 3, pp. 126–131, Sep. 1996, doi: 10.1016/0300-2977(96)00024-1.
- [216] J. M. Bennett *et al.*, “Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group,” *Br. J. Haematol.*, vol. 33, no. 4, pp. 451–458, Aug. 1976, doi: 10.1111/j.1365-2141.1976.tb03563.x.
- [217] J. W. Vardiman *et al.*, “The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes,” *Blood*, vol. 114, no. 5, pp. 937–951, Jul. 2009, doi: 10.1182/blood-2009-03-209262.
- [218] D. A. Arber, “The 2016 WHO classification of acute myeloid leukemia: What the practicing clinician needs to know,” *Semin. Hematol.*, vol. 56, no. 2, pp. 90–95, 2019, doi: 10.1053/j.seminhematol.2018.08.002.
- [219] J. Jung *et al.*, “Reclassification of Acute Myeloid Leukemia According to the 2016 WHO Classification,” *Ann. Lab. Med.*, vol. 39, no. 3, pp. 311–316, May 2019, doi: 10.3343/alm.2019.39.3.311.
- [220] B. Falini, E. Tiacci, M. P. Martelli, S. Ascani, and S. A. Pileri, “New classification of acute myeloid leukemia and precursor-related neoplasms: changes and unsolved issues,” *Discov. Med.*, vol. 10, no. 53, pp. 281–292, Oct. 2010.
- [221] P. J. M. Valk *et al.*, “Prognostically useful gene-expression profiles in acute myeloid leukemia,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 350, no. 16, pp. 1617–1628, Apr. 2004, doi: 10.1056/NEJMoa040465.
- [222] H. Döhner *et al.*, “Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet,” *Blood*, vol. 115, no. 3, pp. 453–474, Jan. 2010, doi: 10.1182/blood-2009-07-235358.

- [223] B. D. Cheson *et al.*, “Revised recommendations of the International Working Group for Diagnosis, Standardization of Response Criteria, Treatment Outcomes, and Reporting Standards for Therapeutic Trials in Acute Myeloid Leukemia,” *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.*, vol. 21, no. 24, pp. 4642–4649, Dec. 2003, doi: 10.1200/JCO.2003.04.036.
- [224] A. S. Prakasha Gowda, J. M. Polizzi, K. A. Eckert, and T. E. Spratt, “Incorporation of gemcitabine and cytarabine into DNA by DNA polymerase beta and ligase III/XRCC1,” *Biochemistry*, vol. 49, no. 23, pp. 4833–4840, Jun. 2010, doi: 10.1021/bi100200c.
- [225] F. W. Perrino, D. J. Mazur, H. Ward, and S. Harvey, “Exonucleases and the incorporation of arnucleotides into DNA,” *Cell Biochem. Biophys.*, vol. 30, no. 3, pp. 331–352, 1999, doi: 10.1007/BF02738118.
- [226] S. Douedi and M. P. Carson, “Anthracycline Medications (Doxorubicin),” in *StatPearls*, Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2019.
- [227] G. Palù, S. Valisena, G. Bertoloni, C. Cera, and M. Palumbo, “A further insight into the mechanism of action of anthracycline antibiotics,” *Microbiologica*, vol. 11, no. 4, pp. 307–319, Oct. 1988.
- [228] R. C. Young, R. F. Ozols, and C. E. Myers, “The anthracycline antineoplastic drugs,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 305, no. 3, pp. 139–153, Jul. 1981, doi: 10.1056/NEJM198107163050305.
- [229] A. Dhall, B. M. Zee, F. Yan, and M. A. Blanco, “Intersection of Epigenetic and Metabolic Regulation of Histone Modifications in Acute Myeloid Leukemia,” *Front. Oncol.*, vol. 9, p. 432, 2019, doi: 10.3389/fonc.2019.00432.
- [230] J. E. Sandoval, Y.-H. Huang, A. Muise, M. A. Goodell, and N. O. Reich, “Mutations in the DNMT3A DNA methyltransferase in acute myeloid leukemia patients cause both loss and gain of function and differential regulation by protein partners,” *J. Biol. Chem.*, vol. 294, no. 13, pp. 4898–4910, 29 2019, doi: 10.1074/jbc.RA118.006795.
- [231] H. J. Ferreira *et al.*, “DNMT3A mutations mediate the epigenetic reactivation of the leukemogenic factor MEIS1 in acute myeloid leukemia,” *Oncogene*, vol. 35, no. 23, pp. 3079–3082, 09 2016, doi: 10.1038/onc.2015.359.
- [232] P. R. Blackburn *et al.*, “Secondary acquisition of BCR-ABL1 fusion in de novo GATA2-MECOM positive acute myeloid leukemia with subsequent emergence of a rare KMT2A-ASXL2 fusion,” *Cancer Genet.*, Dec. 2019, doi: 10.1016/j.cancergen.2019.12.005.
- [233] S. Al-Kershi *et al.*, “The stem cell-specific long noncoding RNA HOXA10-AS in the pathogenesis of KMT2A-rearranged leukemia,” *Blood Adv.*, vol. 3, no. 24, pp. 4252–4263, Dec. 2019, doi: 10.1182/bloodadvances.2019032029.
- [234] A. Abdulwahab, J. Sykes, S. Kamel-Reid, H. Chang, and J. M. Brandwein, “Therapy-related acute lymphoblastic leukemia is more frequent than previously recognized and has a poor prognosis,” *Cancer*, vol. 118, no. 16, pp. 3962–3967, Aug. 2012, doi: 10.1002/cncr.26735.
- [235] R. M. Lowenthal *et al.*, “A phase I/II study of intensive dose escalation of cytarabine in combination with idarubicin and etoposide in induction and consolidation treatment of adult

- acute myeloid leukemia. Australian Leukaemia Study Group (ALSG),” *Leuk. Lymphoma*, vol. 34, no. 5–6, pp. 501–510, Aug. 1999, doi: 10.3109/10428199909058477.
- [236] R. F. Schlenk, “Post-remission therapy for acute myeloid leukemia,” *Haematologica*, vol. 99, no. 11, pp. 1663–1670, Nov. 2014, doi: 10.3324/haematol.2014.114611.
- [237] R. F. Schlenk, S. Jaramillo, and C. Müller-Tidow, “What’s new in consolidation therapy in AML?,” *Semin. Hematol.*, vol. 56, no. 2, pp. 96–101, 2019, doi: 10.1053/j.seminhematol.2018.08.005.
- [238] R. J. Mayer *et al.*, “Intensive postremission chemotherapy in adults with acute myeloid leukemia. Cancer and Leukemia Group B,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 331, no. 14, pp. 896–903, Oct. 1994, doi: 10.1056/NEJM199410063311402.
- [239] C. Sweeney and P. Vyas, “The Graft-Versus-Leukemia Effect in AML,” *Front. Oncol.*, vol. 9, p. 1217, 2019, doi: 10.3389/fonc.2019.01217.
- [240] G. Orti, P. Barba, L. Fox, O. Salamero, F. Bosch, and D. Valcarcel, “Donor lymphocyte infusions in AML and MDS: Enhancing the graft-versus-leukemia effect,” *Exp. Hematol.*, vol. 48, pp. 1–11, 2017, doi: 10.1016/j.exphem.2016.12.004.
- [241] A. A. Kassim and B. N. Savani, “Hematopoietic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia: A review,” *Hematol. Oncol. Stem Cell Ther.*, vol. 10, no. 4, pp. 245–251, Dec. 2017, doi: 10.1016/j.hemonc.2017.05.021.
- [242] C. M. Thomas and P. Campbell, “FLT3 inhibitors in acute myeloid leukemia: Current and future,” *J. Oncol. Pharm. Pract. Off. Publ. Int. Soc. Oncol. Pharm. Pract.*, vol. 25, no. 1, pp. 163–171, Jan. 2019, doi: 10.1177/1078155218802620.
- [243] T. M. Weis, B. L. Marini, D. L. Bixby, and A. J. Perissinotti, “Clinical considerations for the use of FLT3 inhibitors in acute myeloid leukemia,” *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, vol. 141, pp. 125–138, Sep. 2019, doi: 10.1016/j.critrevonc.2019.06.011.
- [244] H. Konig and M. Levis, “Targeting FLT3 to treat leukemia,” *Expert Opin. Ther. Targets*, vol. 19, no. 1, pp. 37–54, Jan. 2015, doi: 10.1517/14728222.2014.960843.
- [245] M. Levis, “Midostaurin approved for FLT3-mutated AML,” *Blood*, vol. 129, no. 26, pp. 3403–3406, 29 2017, doi: 10.1182/blood-2017-05-782292.
- [246] R. M. Stone *et al.*, “Midostaurin plus Chemotherapy for Acute Myeloid Leukemia with a FLT3 Mutation,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 377, no. 5, pp. 454–464, 03 2017, doi: 10.1056/NEJMoa1614359.
- [247] A. E. Eskazan, “Midostaurin in FLT3-Mutated Acute Myeloid Leukemia,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 377, no. 19, p. 1901, 09 2017, doi: 10.1056/NEJMc1711340.
- [248] R. K. Sahoo and L. Kumar, “Midostaurin in FLT3-Mutated Acute Myeloid Leukemia,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 377, no. 19, pp. 1901–1902, 09 2017, doi: 10.1056/NEJMc1711340.
- [249] M. Kim and S. Williams, “Midostaurin in Combination With Standard Chemotherapy for Treatment of Newly Diagnosed FMS-Like Tyrosine Kinase 3 (FLT3) Mutation-Positive

Acute Myeloid Leukemia,” *Ann. Pharmacother.*, vol. 52, no. 4, pp. 364–369, 2018, doi: 10.1177/1060028017747900.

[250] A. Galanis *et al.*, “Crenolanib is a potent inhibitor of FLT3 with activity against resistance-conferring point mutants,” *Blood*, vol. 123, no. 1, pp. 94–100, Jan. 2014, doi: 10.1182/blood-2013-10-529313.

[251] A. E. Perl *et al.*, “Final Results of the Chrysalis Trial: A First-in-Human Phase 1/2 Dose-Escalation, Dose-Expansion Study of Gilteritinib (ASP2215) in Patients with Relapsed/Refractory Acute Myeloid Leukemia (R/R AML),” *Blood*, vol. 128, no. 22, pp. 1069–1069, Dec. 2016, doi: 10.1182/blood.V128.22.1069.1069.

[252] J. E. Cortes *et al.*, “Phase I study of quizartinib administered daily to patients with relapsed or refractory acute myeloid leukemia irrespective of FMS-like tyrosine kinase 3-internal tandem duplication status,” *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.*, vol. 31, no. 29, pp. 3681–3687, Oct. 2013, doi: 10.1200/JCO.2013.48.8783.

[253] A. M. Cook *et al.*, “Role of altered growth factor receptor-mediated JAK2 signaling in growth and maintenance of human acute myeloid leukemia stem cells,” *Blood*, vol. 123, no. 18, pp. 2826–2837, May 2014, doi: 10.1182/blood-2013-05-505735.

[254] S. Igelmann, H. A. Neubauer, and G. Ferbeyre, “STAT3 and STAT5 Activation in Solid Cancers,” *Cancers*, vol. 11, no. 10, Sep. 2019, doi: 10.3390/cancers11101428.

[255] M. S. Redell, M. J. Ruiz, T. A. Alonzo, R. B. Gerbing, and D. J. Tweardy, “Stat3 signaling in acute myeloid leukemia: ligand-dependent and -independent activation and induction of apoptosis by a novel small-molecule Stat3 inhibitor,” *Blood*, vol. 117, no. 21, pp. 5701–5709, May 2011, doi: 10.1182/blood-2010-04-280123.

[256] C. D. Godwin, R. P. Gale, and R. B. Walter, “Gemtuzumab ozogamicin in acute myeloid leukemia,” *Leukemia*, vol. 31, no. 9, pp. 1855–1868, 2017, doi: 10.1038/leu.2017.187.

[257] J. Baron and E. S. Wang, “Gemtuzumab ozogamicin for the treatment of acute myeloid leukemia,” *Expert Rev. Clin. Pharmacol.*, vol. 11, no. 6, pp. 549–559, Jun. 2018, doi: 10.1080/17512433.2018.1478725.

[258] “Gemtuzumab Ozogamicin,” in *LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury*, Bethesda (MD): National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, 2012.

[259] M. Gbadamosi, S. Meshinchi, and J. K. Lamba, “Gemtuzumab ozogamicin for treatment of newly diagnosed CD33-positive acute myeloid leukemia,” *Future Oncol. Lond. Engl.*, vol. 14, no. 30, pp. 3199–3213, Dec. 2018, doi: 10.2217/fon-2018-0325.

[260] F. R. Appelbaum and I. D. Bernstein, “Gemtuzumab ozogamicin for acute myeloid leukemia,” *Blood*, vol. 130, no. 22, pp. 2373–2376, 30 2017, doi: 10.1182/blood-2017-09-797712.

[261] D. S. Pereira *et al.*, “AGS67E, an Anti-CD37 Monomethyl Auristatin E Antibody-Drug Conjugate as a Potential Therapeutic for B/T-Cell Malignancies and AML: A New Role for

- CD37 in AML,” *Mol. Cancer Ther.*, vol. 14, no. 7, pp. 1650–1660, Jul. 2015, doi: 10.1158/1535-7163.MCT-15-0067.
- [262] E. M. Hedgecock, J. G. Culotti, and D. H. Hall, “The unc-5, unc-6, and unc-40 genes guide circumferential migrations of pioneer axons and mesodermal cells on the epidermis in *C. elegans*,” *Neuron*, vol. 4, no. 1, pp. 61–85, Jan. 1990, doi: 10.1016/0896-6273(90)90444-K.
- [263] T. Serafini, T. E. Kennedy, M. J. Gaiko, C. Mirzayan, T. M. Jessell, and M. Tessier-Lavigne, “The netrins define a family of axon outgrowth-promoting proteins homologous to *C. elegans* UNC-6,” *Cell*, vol. 78, no. 3, pp. 409–424, Aug. 1994, doi: 10.1016/0092-8674(94)90420-0.
- [264] R. Harris, L. M. Sabatelli, and M. A. Seeger, “Guidance cues at the *Drosophila* CNS midline: identification and characterization of two *Drosophila* Netrin/UNC-6 homologs,” *Neuron*, vol. 17, no. 2, pp. 217–228, Aug. 1996, doi: 10.1016/s0896-6273(00)80154-3.
- [265] W. B. Gan, V. Y. Wong, A. Phillips, C. Ma, T. R. Gershon, and E. R. Macagno, “Cellular expression of a leech netrin suggests roles in the formation of longitudinal nerve tracts and in regional innervation of peripheral targets,” *J. Neurobiol.*, vol. 40, no. 1, pp. 103–115, Jul. 1999.
- [266] D. Q. Matus, K. Pang, H. Marlow, C. W. Dunn, G. H. Thomsen, and M. Q. Martindale, “Molecular evidence for deep evolutionary roots of bilaterality in animal development,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 103, no. 30, pp. 11195–11200, Jul. 2006, doi: 10.1073/pnas.0601257103.
- [267] K. W. Park *et al.*, “Identification of new netrin family members in zebrafish: developmental expression of netrin 2 and netrin 4,” *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.*, vol. 234, no. 3, pp. 726–731, Nov. 2005, doi: 10.1002/dvdy.20474.
- [268] S. Rajasekharan and T. E. Kennedy, “The netrin protein family,” *Genome Biol.*, vol. 10, no. 9, p. 239, 2009, doi: 10.1186/gb-2009-10-9-239.
- [269] Y. Yin, J. R. Sanes, and J. H. Miner, “Identification and expression of mouse netrin-4,” *Mech. Dev.*, vol. 96, no. 1, pp. 115–119, Aug. 2000, doi: 10.1016/s0925-4773(00)00369-5.
- [270] T. Nakashiba, S. Nishimura, T. Ikeda, and S. Itohara, “Complementary expression and neurite outgrowth activity of netrin-G subfamily members,” *Mech. Dev.*, vol. 111, no. 1–2, pp. 47–60, Feb. 2002, doi: 10.1016/s0925-4773(01)00600-1.
- [271] S. W. Moore, M. Tessier-Lavigne, and T. E. Kennedy, “Netrins and Their receptors,” in *Axon Growth and Guidance*, D. Bagnard, Ed. New York, NY: Springer, 2007, pp. 17–31.
- [272] J. H. Miner and P. D. Yurchenco, “Laminin functions in tissue morphogenesis,” *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, vol. 20, pp. 255–284, 2004, doi: 10.1146/annurev.cellbio.20.010403.094555.
- [273] P. D. Yurchenco and W. G. Wadsworth, “Assembly and tissue functions of early embryonic laminins and netrins,” *Curr. Opin. Cell Biol.*, vol. 16, no. 5, pp. 572–579, Oct. 2004, doi: 10.1016/j.ceb.2004.07.013.

- [274] S. Yamagishi *et al.*, “Netrin-5 is highly expressed in neurogenic regions of the adult brain,” *Front. Cell. Neurosci.*, vol. 9, p. 146, 2015, doi: 10.3389/fncel.2015.00146.
- [275] J. Kappler *et al.*, “Glycosaminoglycan-binding properties and secondary structure of the C-terminus of netrin-1,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 271, no. 2, pp. 287–291, May 2000, doi: 10.1006/bbrc.2000.2583.
- [276] M. J. Barallobre, M. Pascual, J. A. Del Río, and E. Soriano, “The Netrin family of guidance factors: emphasis on Netrin-1 signalling,” *Brain Res. Rev.*, vol. 49, no. 1, pp. 22–47, Jul. 2005, doi: 10.1016/j.brainresrev.2004.11.003.
- [277] K. L. W. Sun, J. P. Correia, and T. E. Kennedy, “Netrins: versatile extracellular cues with diverse functions,” *Development*, vol. 138, no. 11, pp. 2153–2169, Jun. 2011, doi: 10.1242/dev.044529.
- [278] T. E. Kennedy, T. Serafini, JoséR. de la Torre, and M. Tessier-Lavigne, “Netrins are diffusible chemotropic factors for commissural axons in the embryonic spinal cord,” *Cell*, vol. 78, no. 3, pp. 425–435, Aug. 1994, doi: 10.1016/0092-8674(94)90421-9.
- [279] Y. Liu *et al.*, “Novel Role for Netrins in Regulating Epithelial Behavior during Lung Branching Morphogenesis,” *Curr. Biol. CB*, vol. 14, no. 10, pp. 897–905, May 2004, doi: 10.1016/j.cub.2004.05.020.
- [280] T. E. Kennedy, H. Wang, W. Marshall, and M. Tessier-Lavigne, “Axon guidance by diffusible chemoattractants: a gradient of netrin protein in the developing spinal cord,” *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.*, vol. 26, no. 34, pp. 8866–8874, Aug. 2006, doi: 10.1523/JNEUROSCI.5191-05.2006.
- [281] T. Serafini *et al.*, “Netrin-1 is required for commissural axon guidance in the developing vertebrate nervous system,” *Cell*, vol. 87, no. 6, pp. 1001–1014, Dec. 1996, doi: 10.1016/s0092-8674(00)81795-x.
- [282] M. J. Barallobre, “Netrin 1 and hippocampal development,” p. 14.
- [283] M. Dakouane-Giudicelli *et al.*, “Characterization and Expression of Netrin-1 and Its Receptors UNC5B and DCC in Human Placenta,” *J. Histochem. Cytochem.*, vol. 58, no. 1, pp. 73–82, Jan. 2010, doi: 10.1369/jhc.2009.953463.
- [284] J.-S. Kang, M.-J. Yi, W. Zhang, J. L. Feinleib, F. Cole, and R. S. Krauss, “Netrins and neogenin promote myotube formation,” *J. Cell Biol.*, vol. 167, no. 3, pp. 493–504, Nov. 2004, doi: 10.1083/jcb.200405039.
- [285] V. E. Abraira, T. Del Rio, A. F. Tucker, J. Slonimsky, H. L. Keirnes, and L. V. Goodrich, “Cross-repressive interactions between Lrig3 and netrin 1 shape the architecture of the inner ear,” *Dev. Camb. Engl.*, vol. 135, no. 24, pp. 4091–4099, Dec. 2008, doi: 10.1242/dev.029330.
- [286] K. W. Park *et al.*, “The axonal attractant Netrin-1 is an angiogenic factor,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 101, no. 46, pp. 16210–16215, Nov. 2004, doi: 10.1073/pnas.0405984101.

- [287] M. Salminen, B. I. Meyer, E. Bober, and P. Gruss, "Netrin 1 is required for semicircular canal formation in the mouse inner ear," *Dev. Camb. Engl.*, vol. 127, no. 1, pp. 13–22, Jan. 2000.
- [288] P. Strickland, G. C. Shin, A. Plump, M. Tessier-Lavigne, and L. Hinck, "Slit2 and netrin 1 act synergistically as adhesive cues to generate tubular bi-layers during ductal morphogenesis," *Dev. Camb. Engl.*, vol. 133, no. 5, pp. 823–832, Mar. 2006, doi: 10.1242/dev.02261.
- [289] Y. Yang, L. Zou, Y. Wang, K.-S. Xu, J.-X. Zhang, and J.-H. Zhang, "Axon guidance cue Netrin-1 has dual function in angiogenesis," *Cancer Biol. Ther.*, vol. 6, no. 5, pp. 743–748, May 2007, doi: 10.4161/cbt.6.5.3976.
- [290] M. Yebra *et al.*, "Recognition of the neural chemoattractant Netrin-1 by integrins alpha6beta4 and alpha3beta1 regulates epithelial cell adhesion and migration," *Dev. Cell*, vol. 5, no. 5, pp. 695–707, Nov. 2003, doi: 10.1016/s1534-5807(03)00330-7.
- [291] H. Zhang and C. Zhang, "New discovery of Netrin-1 in cardioprotection," *J. Mol. Cell. Cardiol.*, vol. 48, no. 6, pp. 1033–1035, Jun. 2010, doi: 10.1016/j.yjmcc.2009.12.008.
- [292] J. Zhang and H. Cai, "Netrin-1 prevents ischemia/reperfusion-induced myocardial infarction via a DCC/ERK1/2/eNOS s1177/NO/DCC feed-forward mechanism," *J. Mol. Cell. Cardiol.*, vol. 48, no. 6, pp. 1060–1070, Jun. 2010, doi: 10.1016/j.yjmcc.2009.11.020.
- [293] B. Larrivée *et al.*, "Activation of the UNC5B receptor by Netrin-1 inhibits sprouting angiogenesis," *Genes Dev.*, vol. 21, no. 19, pp. 2433–2447, Oct. 2007, doi: 10.1101/gad.437807.
- [294] X. Lu *et al.*, "The netrin receptor UNC5B mediates guidance events controlling morphogenesis of the vascular system," *Nature*, vol. 432, no. 7014, pp. 179–186, Nov. 2004, doi: 10.1038/nature03080.
- [295] K. Srinivasan, P. Strickland, A. Valdes, G. C. Shin, and L. Hinck, "Netrin-1/Neogenin Interaction Stabilizes Multipotent Progenitor Cap Cells during Mammary Gland Morphogenesis," *Dev. Cell*, vol. 4, no. 3, pp. 371–382, Mar. 2003, doi: 10.1016/S1534-5807(03)00054-6.
- [296] B. D. Wilson *et al.*, "Netrins Promote Developmental and Therapeutic Angiogenesis," *Science*, vol. 313, no. 5787, pp. 640–644, Aug. 2006, doi: 10.1126/science.1124704.
- [297] D. Bradford, S. J. Cole, and H. M. Cooper, "Netrin-1: diversity in development," *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 41, no. 3, pp. 487–493, Mar. 2009, doi: 10.1016/j.biocel.2008.03.014.
- [298] C. Manitt, M. A. Colicos, K. M. Thompson, E. Rousselle, A. C. Peterson, and T. E. Kennedy, "Widespread expression of netrin-1 by neurons and oligodendrocytes in the adult mammalian spinal cord," *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.*, vol. 21, no. 11, pp. 3911–3922, Jun. 2001.
- [299] P. Guijarro, S. Simó, M. Pascual, I. Abasolo, J. A. Del Río, and E. Soriano, "Netrin1 exerts a chemorepulsive effect on migrating cerebellar interneurons in a Dcc-independent way," *Mol. Cell. Neurosci.*, vol. 33, no. 4, pp. 389–400, Dec. 2006, doi: 10.1016/j.mcn.2006.08.010.

- [300] T. Hamasaki, S. Goto, S. Nishikawa, and Y. Ushio, "A role of netrin-1 in the formation of the subcortical structure striatum: repulsive action on the migration of late-born striatal neurons," *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.*, vol. 21, no. 12, pp. 4272–4280, Jun. 2001.
- [301] F. J. Livesey and S. P. Hunt, "Netrin and netrin receptor expression in the embryonic mammalian nervous system suggests roles in retinal, striatal, nigral, and cerebellar development," *Mol. Cell. Neurosci.*, vol. 8, no. 6, pp. 417–429, 1997, doi: 10.1006/mcne.1997.0598.
- [302] B. Ellezam, I. Selles-Navarro, C. Manitt, T. E. Kennedy, and L. McKerracher, "Expression of netrin-1 and its receptors DCC and UNC-5H2 after axotomy and during regeneration of adult rat retinal ganglion cells," *Exp. Neurol.*, vol. 168, no. 1, pp. 105–115, Mar. 2001, doi: 10.1006/exnr.2000.7589.
- [303] C. A. Webber *et al.*, "Schwann cells direct peripheral nerve regeneration through the Netrin-1 receptors, DCC and Unc5H2," *Glia*, vol. 59, no. 10, pp. 1503–1517, Oct. 2011, doi: 10.1002/glia.21194.
- [304] A. Bernet and J. Fitamant, "Netrin-1 and its receptors in tumour growth promotion," *Expert Opin. Ther. Targets*, vol. 12, no. 8, pp. 995–1007, Aug. 2008, doi: 10.1517/14728222.12.8.995.
- [305] A. D. Papanastasiou, G. Pampalakis, D. Katsaros, and G. Sotiropoulou, "Netrin-1 overexpression is predictive of ovarian malignancies," *Oncotarget*, vol. 2, no. 5, pp. 363–367, May 2011, doi: 10.18632/oncotarget.258.
- [306] V. Corset, K. T. Nguyen-Ba-Charvet, C. Forcet, E. Moyses, A. Chédotal, and P. Mehlen, "Netrin-1-mediated axon outgrowth and cAMP production requires interaction with adenosine A2b receptor," *Nature*, vol. 407, no. 6805, pp. 747–750, Oct. 2000, doi: 10.1038/35037600.
- [307] E. Stein, Y. Zou, M. Poo, and M. Tessier-Lavigne, "Binding of DCC by Netrin-1 to Mediate Axon Guidance Independent of Adenosine A2B Receptor Activation," *Science*, vol. 291, no. 5510, pp. 1976–1982, Mar. 2001, doi: 10.1126/science.1059391.
- [308] A. Ly, A. Nikolaev, G. Suresh, Y. Zheng, M. Tessier-Lavigne, and E. Stein, "DSCAM is a netrin receptor that collaborates with DCC in mediating turning responses to netrin-1," *Cell*, vol. 133, no. 7, pp. 1241–1254, Jun. 2008, doi: 10.1016/j.cell.2008.05.030.
- [309] S. S. Lee *et al.*, "Netrin-1-Induced Stem Cell Bioactivity Contributes to the Regeneration of Injured Tissues via the Lipid Raft-Dependent Integrin $\alpha 6\beta 4$ Signaling Pathway," *Sci. Rep.*, vol. 6, p. 37526, 24 2016, doi: 10.1038/srep37526.
- [310] A. Stanco *et al.*, "Netrin-1- $\alpha 3\beta 1$ integrin interactions regulate the migration of interneurons through the cortical marginal zone," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 106, no. 18, pp. 7595–7600, May 2009, doi: 10.1073/pnas.0811343106.
- [311] R. W. Burgess, T. J. Jucius, and S. L. Ackerman, "Motor axon guidance of the mammalian trochlear and phrenic nerves: dependence on the netrin receptor Unc5c and modifier loci," *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.*, vol. 26, no. 21, pp. 5756–5766, May 2006, doi: 10.1523/JNEUROSCI.0736-06.2006.

- [312] S. S.-Y. Chan *et al.*, “UNC-40, a *C. elegans* Homolog of DCC (Deleted in Colorectal Cancer), Is Required in Motile Cells Responding to UNC-6 Netrin Cues,” *Cell*, vol. 87, no. 2, pp. 187–195, Oct. 1996, doi: 10.1016/S0092-8674(00)81337-9.
- [313] K. Keino-Masu *et al.*, “Deleted in Colorectal Cancer (DCC) Encodes a Netrin Receptor,” *Cell*, vol. 87, no. 2, pp. 175–185, Oct. 1996, doi: 10.1016/S0092-8674(00)81336-7.
- [314] E. R. Fearon *et al.*, “Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers,” *Science*, vol. 247, no. 4938, pp. 49–56, Jan. 1990, doi: 10.1126/science.2294591.
- [315] A. Bernet and P. Mehlen, “Dependence receptors: when apoptosis controls tumor progression,” *Bull. Cancer (Paris)*, vol. 94, no. 4, pp. E12-17, Apr. 2007.
- [316] H. Arakawa, “Netrin-1 and its receptors in tumorigenesis,” *Nat. Rev. Cancer*, vol. 4, no. 12, pp. 978–987, Dec. 2004, doi: 10.1038/nrc1504.
- [317] R. P. Kruger, J. Lee, W. Li, and K.-L. Guan, “Mapping netrin receptor binding reveals domains of Unc5 regulating its tyrosine phosphorylation,” *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.*, vol. 24, no. 48, pp. 10826–10834, Dec. 2004, doi: 10.1523/JNEUROSCI.3715-04.2004.
- [318] B. V. Geisbrecht, K. A. Dowd, R. W. Barfield, P. A. Longo, and D. J. Leahy, “Netrin Binds Discrete Subdomains of DCC and UNC5 and Mediates Interactions between DCC and Heparin,” *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 35, pp. 32561–32568, Aug. 2003, doi: 10.1074/jbc.M302943200.
- [319] C. Seaman, R. Anderson, B. Emery, and H. M. Cooper, “Localization of the netrin guidance receptor, DCC, in the developing peripheral and enteric nervous systems,” *Mech. Dev.*, vol. 103, no. 1–2, pp. 173–175, May 2001, doi: 10.1016/s0925-4773(01)00350-1.
- [320] C. M. Chuong, T. X. Jiang, E. Yin, and R. B. Widelitz, “cDCC (chicken homologue to a gene deleted in colorectal carcinoma) is an epithelial adhesion molecule expressed in the basal cells and involved in epithelial-mesenchymal interaction,” *Dev. Biol.*, vol. 164, no. 2, pp. 383–397, Aug. 1994, doi: 10.1006/dbio.1994.1208.
- [321] L. Hedrick, K. R. Cho, E. R. Fearon, T. C. Wu, K. W. Kinzler, and B. Vogelstein, “The DCC gene product in cellular differentiation and colorectal tumorigenesis,” *Genes Dev.*, vol. 8, no. 10, pp. 1174–1183, May 1994, doi: 10.1101/gad.8.10.1174.
- [322] A. Latil *et al.*, “Quantification of expression of netrins, slits and their receptors in human prostate tumors,” *Int. J. Cancer*, vol. 103, no. 3, pp. 306–315, Jan. 2003, doi: 10.1002/ijc.10821.
- [323] J. M. Gad, S. L. Keeling, A. F. Wilks, S. S. Tan, and H. M. Cooper, “The expression patterns of guidance receptors, DCC and Neogenin, are spatially and temporally distinct throughout mouse embryogenesis,” *Dev. Biol.*, vol. 192, no. 2, pp. 258–273, Dec. 1997, doi: 10.1006/dbio.1997.8756.
- [324] C. Leung-Hagesteijn *et al.*, “UNC-5, a transmembrane protein with immunoglobulin and thrombospondin type 1 domains, guides cell and pioneer axon migrations in *C. elegans*,” *Cell*, vol. 71, no. 2, pp. 289–299, Oct. 1992, doi: 10.1016/0092-8674(92)90357-I.

- [325] S. L. Ackerman, L. P. Kozak, S. A. Przyborski, L. A. Rund, B. B. Boyer, and B. B. Knowles, “The mouse rostral cerebellar malformation gene encodes an UNC-5-like protein,” *Nature*, vol. 386, no. 6627, pp. 838–842, Apr. 1997, doi: 10.1038/386838a0.
- [326] E. D. Leonardo, L. Hinck, M. Masu, K. Keino-Masu, S. L. Ackerman, and M. Tessier-Lavigne, “Vertebrate homologues of *C. elegans* UNC-5 are candidate netrin receptors,” *Nature*, vol. 386, no. 6627, pp. 833–838, Apr. 1997, doi: 10.1038/386833a0.
- [327] S. L. Ackerman and B. B. Knowles, “Cloning and mapping of the UNC5C gene to human chromosome 4q21-q23,” *Genomics*, vol. 52, no. 2, pp. 205–208, Sep. 1998, doi: 10.1006/geno.1998.5425.
- [328] E. Willott, M. S. Balda, A. S. Fanning, B. Jameson, C. V. Itallie, and J. M. Anderson, “The tight junction protein ZO-1 is homologous to the *Drosophila* discs-large tumor suppressor protein of septate junctions,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 90, no. 16, pp. 7834–7838, Aug. 1993, doi: 10.1073/pnas.90.16.7834.
- [329] M. Itoh, A. Nagafuchi, S. Yonemura, T. Kitani-Yasuda, S. Tsukita, and S. Tsukita, “The 220-kD protein colocalizing with cadherins in non-epithelial cells is identical to ZO-1, a tight junction-associated protein in epithelial cells: cDNA cloning and immunoelectron microscopy,” *J. Cell Biol.*, vol. 121, no. 3, pp. 491–502, mai 1993, doi: 10.1083/jcb.121.3.491.
- [330] M. Sheng, “PDZs and Receptor/Channel Clustering: Rounding Up the Latest Suspects,” *Neuron*, vol. 17, no. 4, pp. 575–578, Oct. 1996, doi: 10.1016/S0896-6273(00)80190-7.
- [331] D. Engelkamp, “Cloning of three mouse *Unc5* genes and their expression patterns at mid-gestation,” *Mech. Dev.*, vol. 118, no. 1–2, pp. 191–197, Oct. 2002, doi: 10.1016/s0925-4773(02)00248-4.
- [332] N. Handa *et al.*, “Structure of the UNC5H2 death domain,” *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, vol. 62, no. Pt 12, pp. 1502–1509, Dec. 2006, doi: 10.1107/S09074444906039369.
- [333] M. Grandin *et al.*, “Structural Decoding of the Netrin-1/UNC5 Interaction and its Therapeutical Implications in Cancers,” *Cancer Cell*, vol. 29, no. 2, pp. 173–185, Feb. 2016, doi: 10.1016/j.ccell.2016.01.001.
- [334] C. Barrett and S. Guthrie, “Expression patterns of the netrin receptor UNC5H1 among developing motor neurons in the embryonic rat hindbrain,” *Mech. Dev.*, vol. 106, no. 1–2, pp. 163–166, Aug. 2001, doi: 10.1016/s0925-4773(01)00415-4.
- [335] Y. Zhong *et al.*, “Identification of the genes that are expressed in the upper layers of the neocortex,” *Cereb. Cortex N. Y. N 1991*, vol. 14, no. 10, pp. 1144–1152, Oct. 2004, doi: 10.1093/cercor/bhh074.
- [336] M. E. Williams *et al.*, “UNC5A promotes neuronal apoptosis during spinal cord development independent of netrin-1,” *Nat. Neurosci.*, vol. 9, no. 8, pp. 996–998, Aug. 2006, doi: 10.1038/nn1736.
- [337] X. Tang *et al.*, “Netrin-1 mediates neuronal survival through PIKE-L interaction with the dependence receptor UNC5B,” *Nat. Cell Biol.*, vol. 10, no. 6, pp. 698–706, Jun. 2008, doi: 10.1038/ncb1732.

- [338] H. K. Lee, I. A. Seo, E. Seo, S.-Y. Seo, H. J. Lee, and H. T. Park, “Netrin-1 induces proliferation of Schwann cells through Unc5b receptor,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 362, no. 4, pp. 1057–1062, Nov. 2007, doi: 10.1016/j.bbrc.2007.08.143.
- [339] J. Lv *et al.*, “Netrin-1 induces the migration of Schwann cells via p38 MAPK and PI3K-Akt signaling pathway mediated by the UNC5B receptor,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 464, no. 1, pp. 263–268, Aug. 2015, doi: 10.1016/j.bbrc.2015.06.140.
- [340] P. W. Lane, R. T. Bronson, and C. A. Spencer, “Rostral cerebellar malformation, (rcm): a new recessive mutation on chromosome 3 of the mouse,” *J. Hered.*, vol. 83, no. 4, pp. 315–318, Aug. 1992, doi: 10.1093/oxfordjournals.jhered.a111221.
- [341] L. M. Eisenman and R. Brothers, “Rostral cerebellar malformation (rcm/rcm): a murine mutant to study regionalization of the cerebellum,” *J. Comp. Neurol.*, vol. 394, no. 1, pp. 106–117, Apr. 1998, doi: 10.1002/(sici)1096-9861(19980427)394:1<106::aid-cne8>3.0.co;2-4.
- [342] S. A. Przyborski, B. B. Knowles, and S. L. Ackerman, “Embryonic phenotype of Unc5h3 mutant mice suggests chemorepulsion during the formation of the rostral cerebellar boundary,” *Dev. Camb. Engl.*, vol. 125, no. 1, pp. 41–50, Jan. 1998.
- [343] M. Takemoto *et al.*, “Laminar and areal expression of unc5d and its role in cortical cell survival,” *Cereb. Cortex N. Y. N 1991*, vol. 21, no. 8, pp. 1925–1934, Aug. 2011, doi: 10.1093/cercor/bhq265.
- [344] S. Dalvin, M. A. Anselmo, P. Prodhan, K. Komatsuzaki, J. J. Schnitzer, and T. B. Kinane, “Expression of Netrin-1 and its two receptors DCC and UNC5H2 in the developing mouse lung,” *Gene Expr. Patterns GEP*, vol. 3, no. 3, pp. 279–283, Jun. 2003, doi: 10.1016/s1567-133x(03)00047-4.
- [345] A. D. Norris and E. A. Lundquist, “UNC-6/netrin and its receptors UNC-5 and UNC-40/DCC modulate growth cone protrusion in vivo in *C. elegans*,” *Dev. Camb. Engl.*, vol. 138, no. 20, pp. 4433–4442, Oct. 2011, doi: 10.1242/dev.068841.
- [346] M. R. Gujar, L. Sundararajan, A. Stricker, and E. A. Lundquist, “Control of Growth Cone Polarity, Microtubule Accumulation, and Protrusion by UNC-6/Netrin and Its Receptors in *Caenorhabditis elegans*,” *Genetics*, vol. 210, no. 1, pp. 235–255, 2018, doi: 10.1534/genetics.118.301234.
- [347] A. Fazeli *et al.*, “Phenotype of mice lacking functional Deleted in colorectal cancer (Dcc) gene,” *Nature*, vol. 386, no. 6627, pp. 796–804, Apr. 1997, doi: 10.1038/386796a0.
- [348] K. Hong, L. Hinck, M. Nishiyama, M. Poo, M. Tessier-Lavigne, and E. Stein, “A Ligand-Gated Association between Cytoplasmic Domains of UNC5 and DCC Family Receptors Converts Netrin-Induced Growth Cone Attraction to Repulsion,” *Cell*, vol. 97, no. 7, pp. 927–941, Jun. 1999, doi: 10.1016/S0092-8674(00)80804-1.
- [349] K. Keleman and B. J. Dickson, “Short- and Long-Range Repulsion by the *Drosophila* Unc5 Netrin Receptor,” *Neuron*, vol. 32, no. 4, pp. 605–617, Nov. 2001, doi: 10.1016/S0896-6273(01)00505-0.

- [350] F. Mille *et al.*, “Interfering with multimerization of netrin-1 receptors triggers tumor cell death,” *Cell Death Differ.*, vol. 16, no. 10, pp. 1344–1351, Oct. 2009, doi: 10.1038/cdd.2009.75.
- [351] L. I. Finci *et al.*, “The crystal structure of netrin-1 in complex with DCC reveals the bi-functionality of netrin-1 as a guidance cue,” *Neuron*, vol. 83, no. 4, pp. 839–849, Aug. 2014, doi: 10.1016/j.neuron.2014.07.010.
- [352] L. Finci, Y. Zhang, R. Meijers, and J.-H. Wang, “Signaling mechanism of the netrin-1 receptor DCC in axon guidance,” *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, vol. 118, no. 3, pp. 153–160, Sep. 2015, doi: 10.1016/j.pbiomolbio.2015.04.001.
- [353] K. Xu *et al.*, “Structures of netrin-1 bound to two receptors provide insight into its axon guidance mechanism,” *Science*, vol. 344, no. 6189, pp. 1275–1279, Jun. 2014, doi: 10.1126/science.1255149.
- [354] Z. Hérincs *et al.*, “DCC association with lipid rafts is required for netrin-1-mediated axon guidance,” *J. Cell Sci.*, vol. 118, no. Pt 8, pp. 1687–1692, Apr. 2005, doi: 10.1242/jcs.02296.
- [355] C. Furne, V. Corset, Z. Hérincs, N. Cahuzac, A.-O. Hueber, and P. Mehlen, “The dependence receptor DCC requires lipid raft localization for cell death signaling,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 103, no. 11, pp. 4128–4133, Mar. 2006, doi: 10.1073/pnas.0507864103.
- [356] H. Matsumoto and M. Nagashima, “Netrin-1 elevates the level and induces cluster formation of its receptor DCC at the surface of cortical axon shafts in an exocytosis-dependent manner,” *Neurosci. Res.*, vol. 67, no. 2, pp. 99–107, Jun. 2010, doi: 10.1016/j.neures.2010.02.004.
- [357] A. A. Gopal *et al.*, “Netrin-1-Regulated Distribution of UNC5B and DCC in Live Cells Revealed by TICCS,” *Biophys. J.*, vol. 110, no. 3, pp. 623–634, Feb. 2016, doi: 10.1016/j.bpj.2015.12.022.
- [358] M. Shekarabi, S. W. Moore, N. X. Tritsch, S. J. Morris, J.-F. Bouchard, and T. E. Kennedy, “Deleted in colorectal cancer binding netrin-1 mediates cell substrate adhesion and recruits Cdc42, Rac1, Pak1, and N-WASP into an intracellular signaling complex that promotes growth cone expansion,” *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.*, vol. 25, no. 12, pp. 3132–3141, Mar. 2005, doi: 10.1523/JNEUROSCI.1920-04.2005.
- [359] G. Liu *et al.*, “p130CAS is required for netrin signaling and commissural axon guidance,” *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.*, vol. 27, no. 4, pp. 957–968, Jan. 2007, doi: 10.1523/JNEUROSCI.4616-06.2007.
- [360] K. Modzelewska, L. P. Newman, R. Desai, and P. J. Keely, “Ack1 mediates Cdc42-dependent cell migration and signaling to p130Cas,” *J. Biol. Chem.*, vol. 281, no. 49, pp. 37527–37535, Dec. 2006, doi: 10.1074/jbc.M604342200.
- [361] X. Li, E. Saint-Cyr-Proulx, K. Aktories, and N. Lamarche-Vane, “Rac1 and Cdc42 but not RhoA or Rho kinase activities are required for neurite outgrowth induced by the Netrin-1 receptor DCC (deleted in colorectal cancer) in N1E-115 neuroblastoma cells,” *J. Biol. Chem.*, vol. 277, no. 17, pp. 15207–15214, Apr. 2002, doi: 10.1074/jbc.M109913200.

- [362] M. Shekarabi and T. E. Kennedy, “The netrin-1 receptor DCC promotes filopodia formation and cell spreading by activating Cdc42 and Rac1,” *Mol. Cell. Neurosci.*, vol. 19, no. 1, pp. 1–17, Jan. 2002, doi: 10.1006/mcne.2001.1075.
- [363] G. L. Ming, H. J. Song, B. Berninger, C. E. Holt, M. Tessier-Lavigne, and M. M. Poo, “cAMP-dependent growth cone guidance by netrin-1,” *Neuron*, vol. 19, no. 6, pp. 1225–1235, Dec. 1997, doi: 10.1016/s0896-6273(00)80414-6.
- [364] H. Akiyama, T. Fukuda, T. Tojima, V. O. Nikolaev, and H. Kamiguchi, “Cyclic Nucleotide Control of Microtubule Dynamics for Axon Guidance,” *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.*, vol. 36, no. 20, pp. 5636–5649, 18 2016, doi: 10.1523/JNEUROSCI.3596-15.2016.
- [365] D. J. Sutherland and G. J. Goodhill, “The interdependent roles of Ca(2+) and cAMP in axon guidance,” *Dev. Neurobiol.*, vol. 75, no. 4, pp. 402–410, Apr. 2015, doi: 10.1002/dneu.22144.
- [366] D. J. Sutherland, Z. Pujic, and G. J. Goodhill, “Calcium signaling in axon guidance,” *Trends Neurosci.*, vol. 37, no. 8, pp. 424–432, Aug. 2014, doi: 10.1016/j.tins.2014.05.008.
- [367] M. Nishiyama *et al.*, “Cyclic AMP/GMP-dependent modulation of Ca²⁺ channels sets the polarity of nerve growth-cone turning,” *Nature*, vol. 423, no. 6943, pp. 990–995, Jun. 2003, doi: 10.1038/nature01751.
- [368] K. Y. Wu *et al.*, “Soluble adenylyl cyclase is required for netrin-1 signaling in nerve growth cones,” *Nat. Neurosci.*, vol. 9, no. 10, pp. 1257–1264, Oct. 2006, doi: 10.1038/nn1767.
- [369] C. Forcet *et al.*, “Netrin-1-mediated axon outgrowth requires deleted in colorectal cancer-dependent MAPK activation,” *Nature*, vol. 417, no. 6887, pp. 443–447, May 2002, doi: 10.1038/nature748.
- [370] D. S. Campbell and C. E. Holt, “Apoptotic pathway and MAPKs differentially regulate chemotropic responses of retinal growth cones,” *Neuron*, vol. 37, no. 6, pp. 939–952, Mar. 2003, doi: 10.1016/s0896-6273(03)00158-2.
- [371] T. Masuda, K. Watanabe, C. Sakuma, K. Ikenaka, K. Ono, and H. Yaginuma, “Netrin-1 acts as a repulsive guidance cue for sensory axonal projections toward the spinal cord,” *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.*, vol. 28, no. 41, pp. 10380–10385, Oct. 2008, doi: 10.1523/JNEUROSCI.1926-08.2008.
- [372] J. Lee, W. Li, and K.-L. Guan, “SRC-1 mediates UNC-5 signaling in *Caenorhabditis elegans*,” *Mol. Cell. Biol.*, vol. 25, no. 15, pp. 6485–6495, Aug. 2005, doi: 10.1128/MCB.25.15.6485-6495.2005.
- [373] J. Tong, M. Killeen, R. Steven, K. L. Binns, J. Culotti, and T. Pawson, “Netrin stimulates tyrosine phosphorylation of the UNC-5 family of netrin receptors and induces Shp2 binding to the RCM cytodomain,” *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 44, pp. 40917–40925, Nov. 2001, doi: 10.1074/jbc.M103872200.
- [374] M. Killeen *et al.*, “UNC-5 function requires phosphorylation of cytoplasmic tyrosine 482, but its UNC-40-independent functions also require a region between the ZU-5 and death domains,” *Dev. Biol.*, vol. 251, no. 2, pp. 348–366, Nov. 2002, doi: 10.1006/dbio.2002.0825.

- [375] K. Komatsuzaki, S. Dalvin, and T. B. Kinane, "Modulation of G(α (2)) signaling by the axonal guidance molecule UNC5H2," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 297, no. 4, pp. 898–905, Oct. 2002, doi: 10.1016/s0006-291x(02)02277-5.
- [376] M. E. Williams, S. C.-Y. Wu, W. L. McKenna, and L. Hinck, "Surface expression of the netrin receptor UNC5H1 is regulated through a protein kinase C-interacting protein/protein kinase-dependent mechanism," *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.*, vol. 23, no. 36, pp. 11279–11288, Dec. 2003.
- [377] J. L. Bartoe *et al.*, "Protein interacting with C-kinase 1/protein kinase C-mediated endocytosis converts netrin-1-mediated repulsion to attraction," *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.*, vol. 26, no. 12, pp. 3192–3205, Mar. 2006, doi: 10.1523/JNEUROSCI.3469-05.2006.
- [378] P. Mehlen, S. Rabizadeh, S. J. Snipas, N. Assa-Munt, G. S. Salvesen, and D. E. Bredesen, "The DCC gene product induces apoptosis by a mechanism requiring receptor proteolysis," *Nature*, vol. 395, no. 6704, pp. 801–804, Oct. 1998, doi: 10.1038/27441.
- [379] K. Thiébaud *et al.*, "The netrin-1 receptors UNC5H are putative tumor suppressors controlling cell death commitment," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 100, no. 7, pp. 4173–4178, Apr. 2003, doi: 10.1073/pnas.0738063100.
- [380] F. Llambi, "Netrin-1 acts as a survival factor via its receptors UNC5H and DCC," *EMBO J.*, vol. 20, no. 11, pp. 2715–2722, Jun. 2001, doi: 10.1093/emboj/20.11.2715.
- [381] F. Llambi *et al.*, "The dependence receptor UNC5H2 mediates apoptosis through DAP-kinase," *EMBO J.*, vol. 24, no. 6, pp. 1192–1201, Mar. 2005, doi: 10.1038/sj.emboj.7600584.
- [382] C. Maise *et al.*, "Lipid raft localization and palmitoylation: identification of two requirements for cell death induction by the tumor suppressors UNC5H," *Exp. Cell Res.*, vol. 314, no. 14, pp. 2544–2552, Aug. 2008, doi: 10.1016/j.yexcr.2008.06.001.
- [383] C. Forcet *et al.*, "The dependence receptor DCC (deleted in colorectal cancer) defines an alternative mechanism for caspase activation," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 98, no. 6, pp. 3416–3421, Mar. 2001, doi: 10.1073/pnas.051378298.
- [384] J. Liu *et al.*, "Mediation of the DCC Apoptotic Signal by DIP13 α ," *J. Biol. Chem.*, vol. 277, no. 29, pp. 26281–26285, Jul. 2002, doi: 10.1074/jbc.M204679200.
- [385] H. Wang *et al.*, "A newly identified dependence receptor UNC5H4 is induced during DNA damage-mediated apoptosis and transcriptional target of tumor suppressor p53," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 370, no. 4, pp. 594–598, Jun. 2008, doi: 10.1016/j.bbrc.2008.03.152.
- [386] Y. Zhu *et al.*, "Dependence receptor UNC5D mediates nerve growth factor depletion-induced neuroblastoma regression," *J. Clin. Invest.*, vol. 123, no. 7, pp. 2935–2947, Jul. 2013, doi: 10.1172/JCI65988.
- [387] M. Wetzel-Smith *et al.*, "A rare mutation in UNC5C predisposes to Alzheimer's disease and increases neuronal cell death," *Nat. Med.*, vol. 20, no. 12, pp. 1452–1457, Dec. 2014, doi: 10.1038/nm.3736.

- [388] M. E. Williams, P. Strickland, K. Watanabe, and L. Hinck, "UNC5H1 Induces Apoptosis via Its Juxtamembrane Region through an Interaction with NRAGE," *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 19, pp. 17483–17490, May 2003, doi: 10.1074/jbc.M300415200.
- [389] A. H. Salehi *et al.*, "NRAGE, a novel MAGE protein, interacts with the p75 neurotrophin receptor and facilitates nerve growth factor-dependent apoptosis," *Neuron*, vol. 27, no. 2, pp. 279–288, Aug. 2000, doi: 10.1016/s0896-6273(00)00036-2.
- [390] B. W. Jordan *et al.*, "Neurotrophin receptor-interacting mage homologue is an inducible inhibitor of apoptosis protein-interacting protein that augments cell death," *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 43, pp. 39985–39989, Oct. 2001, doi: 10.1074/jbc.C100171200.
- [391] A. H. Salehi, S. Xanthoudakis, and P. A. Barker, "NRAGE, a p75 neurotrophin receptor-interacting protein, induces caspase activation and cell death through a JNK-dependent mitochondrial pathway," *J. Biol. Chem.*, vol. 277, no. 50, pp. 48043–48050, Dec. 2002, doi: 10.1074/jbc.M205324200.
- [392] C. Guenebeaud *et al.*, "The Dependence Receptor UNC5H2/B Triggers Apoptosis via PP2A-Mediated Dephosphorylation of DAP Kinase," *Mol. Cell*, vol. 40, no. 6, pp. 863–876, Dec. 2010, doi: 10.1016/j.molcel.2010.11.021.
- [393] Y. Hashimoto, Y. Toyama, S. Kusakari, M. Nawa, and M. Matsuoka, "An Alzheimer Disease-linked Rare Mutation Potentiates Netrin Receptor Uncoordinated-5C-induced Signaling That Merges with Amyloid β Precursor Protein Signaling," *J. Biol. Chem.*, vol. 291, no. 23, pp. 12282–12293, Jun. 2016, doi: 10.1074/jbc.M115.698092.
- [394] P. Singh, P. Ravanan, and P. Talwar, "Death Associated Protein Kinase 1 (DAPK1): A Regulator of Apoptosis and Autophagy," *Front. Mol. Neurosci.*, vol. 9, p. 46, 2016, doi: 10.3389/fnmol.2016.00046.
- [395] C. Tanikawa, K. Matsuda, S. Fukuda, Y. Nakamura, and H. Arakawa, "p53RDL1 regulates p53-dependent apoptosis," *Nat. Cell Biol.*, vol. 5, no. 3, pp. 216–223, Mar. 2003, doi: 10.1038/ncb943.
- [396] P. Rosenberger *et al.*, "Hypoxia-inducible factor-dependent induction of netrin-1 dampens inflammation caused by hypoxia," *Nat. Immunol.*, vol. 10, no. 2, pp. 195–202, Feb. 2009, doi: 10.1038/ni.1683.
- [397] S. K. Shin *et al.*, "Epigenetic and Genetic Alterations in Netrin-1 Receptors UNC5C and DCC in Human Colon Cancer," *Gastroenterology*, vol. 133, no. 6, pp. 1849–1857, Dec. 2007, doi: 10.1053/j.gastro.2007.08.074.
- [398] A. Paradisi *et al.*, "NF-kappaB regulates netrin-1 expression and affects the conditional tumor suppressive activity of the netrin-1 receptors," *Gastroenterology*, vol. 135, no. 4, pp. 1248–1257, Oct. 2008, doi: 10.1053/j.gastro.2008.06.080.
- [399] A. Paradisi *et al.*, "Netrin-1 up-regulation in inflammatory bowel diseases is required for colorectal cancer progression," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 106, no. 40, pp. 17146–17151, Oct. 2009, doi: 10.1073/pnas.0901767106.

- [400] J. Fitamant *et al.*, “Netrin-1 expression confers a selective advantage for tumor cell survival in metastatic breast cancer,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 105, no. 12, pp. 4850–4855, Mar. 2008, doi: 10.1073/pnas.0709810105.
- [401] C. Delloye-Bourgeois *et al.*, “Interference With Netrin-1 and Tumor Cell Death in Non–Small Cell Lung Cancer,” *JNCI J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 101, no. 4, pp. 237–247, Feb. 2009, doi: 10.1093/jnci/djn491.
- [402] C. Delloye-Bourgeois *et al.*, “Netrin-1 acts as a survival factor for aggressive neuroblastoma,” *J. Exp. Med.*, vol. 206, no. 4, pp. 833–847, Apr. 2009, doi: 10.1084/jem.20082299.
- [403] C. J. Aslakson and F. R. Miller, “Selective events in the metastatic process defined by analysis of the sequential dissemination of subpopulations of a mouse mammary tumor,” *Cancer Res.*, vol. 52, no. 6, pp. 1399–1405, Mar. 1992.
- [404] L. Dumartin *et al.*, “Netrin-1 mediates early events in pancreatic adenocarcinoma progression, acting on tumor and endothelial cells,” *Gastroenterology*, vol. 138, no. 4, pp. 1595–1606, 1606.e1–8, Apr. 2010, doi: 10.1053/j.gastro.2009.12.061.
- [405] A. Paradisi and P. Mehlen, “Netrin-1, a missing link between chronic inflammation and tumor progression,” *Cell Cycle Georget. Tex.*, vol. 9, no. 7, pp. 1253–1262, Apr. 2010, doi: 10.4161/cc.9.7.11072.
- [406] A. Paradisi *et al.*, “Combining chemotherapeutic agents and netrin-1 interference potentiates cancer cell death,” *EMBO Mol. Med.*, vol. 5, no. 12, pp. 1821–1834, Dec. 2013, doi: 10.1002/emmm.201302654.
- [407] T. Akino *et al.*, “Netrin-1 Promotes Medulloblastoma Cell Invasiveness and Angiogenesis, and Demonstrates Elevated Expression in Tumor Tissue and Urine of Patients with Pediatric Medulloblastoma,” *Cancer Res.*, vol. 74, no. 14, pp. 3716–3726, Jul. 2014, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-3116.
- [408] K. R. Cho *et al.*, “The DCC gene: structural analysis and mutations in colorectal carcinomas,” *Genomics*, vol. 19, no. 3, pp. 525–531, Feb. 1994, doi: 10.1006/geno.1994.1102.
- [409] D. T. Bishop and H. J. Thomas, “The genetics of colorectal cancer,” *Cancer Surv.*, vol. 9, no. 4, pp. 585–604, 1990.
- [410] T. Goi, A. Yamaguchi, G. Nakagawara, T. Urano, H. Shiku, and K. Furukawa, “Reduced expression of deleted colorectal carcinoma (DCC) protein in established colon cancers,” *Br. J. Cancer*, vol. 77, no. 3, pp. 466–471, 1998, doi: 10.1038/bjc.1998.74.
- [411] S. Thiagalingam *et al.*, “Evaluation of candidate tumour suppressor genes on chromosome 18 in colorectal cancers,” *Nat. Genet.*, vol. 13, no. 3, pp. 343–346, Jul. 1996, doi: 10.1038/ng0796-343.
- [412] J. Jen *et al.*, “Allelic loss of chromosome 18q and prognosis in colorectal cancer,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 331, no. 4, pp. 213–221, Jul. 1994, doi: 10.1056/NEJM199407283310401.
- [413] B. Vogelstein *et al.*, “Genetic alterations during colorectal-tumor development,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 319, no. 9, pp. 525–532, Sep. 1988, doi: 10.1056/NEJM198809013190901.

- [414] M. Saito *et al.*, “Expression of DCC protein in colorectal tumors and its relationship to tumor progression and metastasis,” *Oncology*, vol. 56, no. 2, pp. 134–141, 1999, doi: 10.1159/000011954.
- [415] D. Shibata *et al.*, “The DCC protein and prognosis in colorectal cancer,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 335, no. 23, pp. 1727–1732, Dec. 1996, doi: 10.1056/NEJM199612053352303.
- [416] P. Mehlen and E. R. Fearon, “Role of the Dependence Receptor DCC in Colorectal Cancer Pathogenesis,” *J. Clin. Oncol.*, vol. 22, no. 16, pp. 3420–3428, août 2004, doi: 10.1200/JCO.2004.02.019.
- [417] W. Hilgers, J. J. Song, M. Haye, R. R. Hruban, S. E. Kern, and E. R. Fearon, “Homozygous deletions inactivate DCC, but not MADH4/DPC4/SMAD4, in a subset of pancreatic and biliary cancers,” *Genes. Chromosomes Cancer*, vol. 27, no. 4, pp. 353–357, Apr. 2000.
- [418] V. V. Murty *et al.*, “Frequent allelic deletions and loss of expression characterize the DCC gene in male germ cell tumors,” *Oncogene*, vol. 9, no. 11, pp. 3227–3231, Nov. 1994.
- [419] A. R. Shoemaker, C. Luongo, A. R. Moser, L. J. Marton, and W. F. Dove, “Somatic mutational mechanisms involved in intestinal tumor formation in Min mice,” *Cancer Res.*, vol. 57, no. 10, pp. 1999–2006, May 1997.
- [420] J. R. Howe *et al.*, “Mutations in the SMAD4/DPC4 gene in juvenile polyposis,” *Science*, vol. 280, no. 5366, pp. 1086–1088, May 1998, doi: 10.1126/science.280.5366.1086.
- [421] R. Ogawa *et al.*, “Loss of SMAD4 Promotes Colorectal Cancer Progression by Recruiting Tumor-Associated Neutrophils via the CXCL1/8-CXCR2 Axis,” *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.*, vol. 25, no. 9, pp. 2887–2899, 01 2019, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-18-3684.
- [422] N. Ohtaki *et al.*, “Somatic alterations of the DPC4 and Madr2 genes in colorectal cancers and relationship to metastasis,” *Int. J. Oncol.*, vol. 18, no. 2, pp. 265–270, Feb. 2001, doi: 10.3892/ijo.18.2.265.
- [423] R. Salovaara *et al.*, “Frequent loss of SMAD4/DPC4 protein in colorectal cancers,” *Gut*, vol. 51, no. 1, pp. 56–59, Jul. 2002, doi: 10.1136/gut.51.1.56.
- [424] E. R. Fearon and W. E. Pierceall, “The deleted in colorectal cancer (DCC) gene: a candidate tumour suppressor gene encoding a cell surface protein with similarity to neural cell adhesion molecules,” *Cancer Surv.*, vol. 24, pp. 3–17, 1995.
- [425] H. Kato *et al.*, “Suppressed tumorigenicity of human endometrial cancer cells by the restored expression of the DCC gene,” *Br. J. Cancer*, vol. 82, no. 2, pp. 459–466, Jan. 2000, doi: 10.1054/bjoc.1999.0943.
- [426] A. Velcich, G. Corner, L. Palumbo, and L. Augenlicht, “Altered phenotype of HT29 colonic adenocarcinoma cells following expression of the DCC gene,” *Oncogene*, vol. 18, no. 16, pp. 2599–2606, Apr. 1999, doi: 10.1038/sj.onc.1202610.

- [427] H. D. Kato *et al.*, “Expression of DCC and netrin-1 in normal human endometrium and its implication in endometrial carcinogenesis,” *Gynecol. Oncol.*, vol. 95, no. 2, pp. 281–289, Nov. 2004, doi: 10.1016/j.ygyno.2004.07.050.
- [428] M. Castets *et al.*, “DCC constrains tumour progression via its dependence receptor activity,” *Nature*, vol. 482, no. 7386, pp. 534–537, Dec. 2011, doi: 10.1038/nature10708.
- [429] A. Bernet *et al.*, “Inactivation of the UNC5C Netrin-1 Receptor Is Associated With Tumor Progression in Colorectal Malignancies,” *Gastroenterology*, vol. 133, no. 6, pp. 1840–1848, Dec. 2007, doi: 10.1053/j.gastro.2007.08.009.
- [430] K. Hibi, H. Mizukami, A. Shirahata, T. Goto, M. Sakata, and Y. Sanada, “Aberrant Methylation of the Netrin-1 Receptor Genes UNC5C and DCC Detected in Advanced Colorectal Cancer,” *World J. Surg.*, vol. 33, no. 5, pp. 1053–1057, May 2009, doi: 10.1007/s00268-008-9909-x.
- [431] S. R. Payne and C. J. Kemp, “Tumor suppressor genetics,” *Carcinogenesis*, vol. 26, no. 12, pp. 2031–2045, Dec. 2005, doi: 10.1093/carcin/bgi223.
- [432] P. Liu *et al.*, “Genome-Wide Association and Fine Mapping of Genetic Loci Predisposing to Colon Carcinogenesis in Mice,” *Mol. Cancer Res.*, vol. 10, no. 1, pp. 66–74, Jan. 2012, doi: 10.1158/1541-7786.MCR-10-0540.
- [433] M.-M. Coissieux *et al.*, “Variants in the Netrin-1 Receptor UNC5C Prevent Apoptosis and Increase Risk of Familial Colorectal Cancer,” *Gastroenterology*, vol. 141, no. 6, pp. 2039–2046, Dec. 2011, doi: 10.1053/j.gastro.2011.08.041.
- [434] S. Küry *et al.*, “Evaluation of the colorectal cancer risk conferred by rare UNC5C alleles,” *World J. Gastroenterol. WJG*, vol. 20, no. 1, pp. 204–213, Jan. 2014, doi: 10.3748/wjg.v20.i1.204.
- [435] K. Thiebault *et al.*, “The netrin-1 receptors UNC5H are putative tumor suppressors controlling cell death commitment,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 100, no. 7, pp. 4173–4178, Apr. 2003, doi: 10.1073/pnas.0738063100.
- [436] L. Broutier *et al.*, “Targeting netrin-1/DCC interaction in diffuse large B-cell and mantle cell lymphomas,” *EMBO Mol. Med.*, vol. 8, no. 2, pp. 96–104, Feb. 2016, doi: 10.15252/emmm.201505480.
- [437] M. Grandin *et al.*, “Inhibition of DNA methylation promotes breast tumor sensitivity to netrin-1 interference,” *EMBO Mol. Med.*, vol. 8, no. 8, pp. 863–877, 2016, doi: 10.15252/emmm.201505945.
- [438] “First in Human Evaluation of Safety, Pharmacokinetics, and Clinical Activity of a Monoclonal Antibody Targeting Netrin 1 in Patients With Advanced/Metastatic Solid Tumors - Full Text View - ClinicalTrials.gov.” <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02977195> (accessed Feb. 03, 2020).
- [439] M. L. Mikkola, “TNF superfamily in skin appendage development,” *Cytokine Growth Factor Rev.*, vol. 19, no. 3–4, pp. 219–230, Aug. 2008, doi: 10.1016/j.cytogfr.2008.04.008.

- [440] A. Clarke, D. I. Phillips, R. Brown, and P. S. Harper, "Clinical aspects of X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia.," *Arch. Dis. Child.*, vol. 62, no. 10, pp. 989–996, Oct. 1987, doi: 10.1136/adc.62.10.989.
- [441] G. Blüschke, K.-D. Nüsken, and H. Schneider, "Prevalence and prevention of severe complications of hypohidrotic ectodermal dysplasia in infancy," *Early Hum. Dev.*, vol. 86, no. 7, pp. 397–399, Jul. 2010, doi: 10.1016/j.earlhumdev.2010.04.008.
- [442] J. Kere *et al.*, "X-linked anhidrotic (hypohidrotic) ectodermal dysplasia is caused by mutation in a novel transmembrane protein," *Nat. Genet.*, vol. 13, no. 4, pp. 409–416, Aug. 1996, doi: 10.1038/ng0895-409.
- [443] T. Hashimoto, C.-Y. Cui, and D. Schlessinger, "Repertoire of mouse ectodysplasin-A (EDA-A) isoforms," *Gene*, vol. 371, no. 1, pp. 42–51, Apr. 2006, doi: 10.1016/j.gene.2005.11.003.
- [444] M. Bayés *et al.*, "The anhidrotic ectodermal dysplasia gene (EDA) undergoes alternative splicing and encodes ectodysplasin-A with deletion mutations in collagenous repeats," *Hum. Mol. Genet.*, vol. 7, no. 11, pp. 1661–1669, Oct. 1998, doi: 10.1093/hmg/7.11.1661.
- [445] M. Yan *et al.*, "Two-amino acid molecular switch in an epithelial morphogen that regulates binding to two distinct receptors," *Science*, vol. 290, no. 5491, pp. 523–527, Oct. 2000, doi: 10.1126/science.290.5491.523.
- [446] S. G. Hymowitz *et al.*, "The crystal structures of EDA-A1 and EDA-A2: splice variants with distinct receptor specificity," *Struct. Lond. Engl.* 1993, vol. 11, no. 12, pp. 1513–1520, Dec. 2003, doi: 10.1016/j.str.2003.11.009.
- [447] P. Schneider *et al.*, "Mutations leading to X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia affect three major functional domains in the tumor necrosis factor family member ectodysplasin-A," *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 22, pp. 18819–18827, Jun. 2001, doi: 10.1074/jbc.M101280200.
- [448] G. Mues *et al.*, "Functional analysis of Ectodysplasin-A mutations causing selective tooth agenesis," *Eur. J. Hum. Genet. EJHG*, vol. 18, no. 1, pp. 19–25, Jan. 2010, doi: 10.1038/ejhg.2009.127.
- [449] L. K. Swee *et al.*, "Biological activity of ectodysplasin A is conditioned by its collagen and heparan sulfate proteoglycan-binding domains," *J. Biol. Chem.*, vol. 284, no. 40, pp. 27567–27576, Oct. 2009, doi: 10.1074/jbc.M109.042259.
- [450] D. J. Headon and P. A. Overbeek, "Involvement of a novel Tnf receptor homologue in hair follicle induction," *Nat. Genet.*, vol. 22, no. 4, pp. 370–374, Aug. 1999, doi: 10.1038/11943.
- [451] D. J. Headon *et al.*, "Gene defect in ectodermal dysplasia implicates a death domain adapter in development," *Nature*, vol. 414, no. 6866, pp. 913–916, Dec. 2001, doi: 10.1038/414913a.
- [452] M. Yan, Z. Zhang, J. R. Brady, S. Schilbach, W. J. Fairbrother, and V. M. Dixit, "Identification of a novel death domain-containing adaptor molecule for ectodysplasin-A

receptor that is mutated in crinkled mice,” *Curr. Biol. CB*, vol. 12, no. 5, pp. 409–413, Mar. 2002, doi: 10.1016/s0960-9822(02)00687-5.

[453] S. K. Sinha, S. Zachariah, H. I. Quiñones, M. Shindo, and P. M. Chaudhary, “Role of TRAF3 and -6 in the activation of the NF-kappa B and JNK pathways by X-linked ectodermal dysplasia receptor,” *J. Biol. Chem.*, vol. 277, no. 47, pp. 44953–44961, Nov. 2002, doi: 10.1074/jbc.M207923200.

[454] O. Elomaa, K. Pulkkinen, U. Hannelius, M. Mikkola, U. Saarialho-Kere, and J. Kere, “Ectodysplasin is released by proteolytic shedding and binds to the EDAR protein,” *Hum. Mol. Genet.*, vol. 10, no. 9, pp. 953–962, Apr. 2001, doi: 10.1093/hmg/10.9.953.

[455] A. S. Tucker *et al.*, “Edar/Eda interactions regulate enamel knot formation in tooth morphogenesis,” *Dev. Camb. Engl.*, vol. 127, no. 21, pp. 4691–4700, Nov. 2000.

[456] A. Kumar, M. T. Eby, S. Sinha, A. Jasmin, and P. M. Chaudhary, “The Ectodermal Dysplasia Receptor Activates the Nuclear Factor- κ B, JNK, and Cell Death Pathways and Binds to Ectodysplasin A,” *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 4, pp. 2668–2677, Jan. 2001, doi: 10.1074/jbc.M008356200.

[457] J. Laurikkala *et al.*, “Regulation of hair follicle development by the TNF signal ectodysplasin and its receptor Edar,” *Development*, vol. 129, no. 10, pp. 2541–2553, May 2002.

[458] M. L. Mikkola, “Genetic basis of skin appendage development,” *Semin. Cell Dev. Biol.*, vol. 18, no. 2, pp. 225–236, Apr. 2007, doi: 10.1016/j.semcdb.2007.01.007.

[459] R. Schmidt-Ullrich and R. Paus, “Molecular principles of hair follicle induction and morphogenesis,” *BioEssays*, vol. 27, no. 3, pp. 247–261, 2005, doi: 10.1002/bies.20184.

[460] S. E. Millar, “Molecular Mechanisms Regulating Hair Follicle Development,” *J. Invest. Dermatol.*, vol. 118, no. 2, pp. 216–225, Feb. 2002, doi: 10.1046/j.0022-202x.2001.01670.x.

[461] S. E. Millar *et al.*, “WNT Signaling in the Control of Hair Growth and Structure,” *Dev. Biol.*, vol. 207, no. 1, pp. 133–149, Mar. 1999, doi: 10.1006/dbio.1998.9140.

[462] A. K. Srivastava *et al.*, “The Tabby phenotype is caused by mutation in a mouse homologue of the EDA gene that reveals novel mouse and human exons and encodes a protein (ectodysplasin-A) with collagenous domains,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 94, no. 24, pp. 13069–13074, Nov. 1997, doi: 10.1073/pnas.94.24.13069.

[463] O. Montonen *et al.*, “The gene defective in anhidrotic ectodermal dysplasia is expressed in the developing epithelium, neuroectoderm, thymus, and bone,” *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.*, vol. 46, no. 3, pp. 281–289, Mar. 1998, doi: 10.1177/002215549804600301.

[464] O. Montonen *et al.*, “Expression of the anhidrotic ectodermal dysplasia gene is reduced in skin cancer coinciding with reduced E-cadherin,” *Exp. Dermatol.*, vol. 7, no. 4, pp. 168–174, Aug. 1998, doi: 10.1111/j.1600-0625.1998.tb00319.x.

[465] P. Koppinen, J. Pispa, J. Laurikkala, I. Thesleff, and M. L. Mikkola, “Signaling and subcellular localization of the TNF receptor Edar,” *Exp. Cell Res.*, vol. 269, no. 2, pp. 180–192, Oct. 2001, doi: 10.1006/excr.2001.5331.

- [466] A. Naito *et al.*, “TRAF6-deficient mice display hypohidrotic ectodermal dysplasia,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 99, no. 13, pp. 8766–8771, Jun. 2002, doi: 10.1073/pnas.132636999.
- [467] S. Ghosh and M. Karin, “Missing pieces in the NF-kappaB puzzle,” *Cell*, vol. 109 Suppl, pp. S81–96, Apr. 2002, doi: 10.1016/s0092-8674(02)00703-1.
- [468] J. Zonana *et al.*, “A novel X-linked disorder of immune deficiency and hypohidrotic ectodermal dysplasia is allelic to incontinentia pigmenti and due to mutations in IKK-gamma (NEMO),” *Am. J. Hum. Genet.*, vol. 67, no. 6, pp. 1555–1562, Dec. 2000, doi: 10.1086/316914.
- [469] S. Mansour *et al.*, “Incontinentia pigmenti in a surviving male is accompanied by hypohidrotic ectodermal dysplasia and recurrent infection,” *Am. J. Med. Genet.*, vol. 99, no. 2, pp. 172–177, Mar. 2001, doi: 10.1002/1096-8628(2001)9999:9999<:aid-ajmg1155>3.0.co;2-y.
- [470] R. Döffinger *et al.*, “X-linked anhidrotic ectodermal dysplasia with immunodeficiency is caused by impaired NF-kappaB signaling,” *Nat. Genet.*, vol. 27, no. 3, pp. 277–285, Mar. 2001, doi: 10.1038/85837.
- [471] R. Schmidt-Ullrich, T. Aebischer, J. Hülsken, W. Birchmeier, U. Klemm, and C. Scheidereit, “Requirement of NF-kappaB/Rel for the development of hair follicles and other epidermal appendices,” *Dev. Camb. Engl.*, vol. 128, no. 19, pp. 3843–3853, Oct. 2001.
- [472] V. A. Botchkarev *et al.*, “Noggin is a mesenchymally derived stimulator of hair-follicle induction,” *Nat. Cell Biol.*, vol. 1, no. 3, pp. 158–164, Jul. 1999, doi: 10.1038/11078.
- [473] M. Magerl *et al.*, “Patterns of proliferation and apoptosis during murine hair follicle morphogenesis,” *J. Invest. Dermatol.*, vol. 116, no. 6, pp. 947–955, Jun. 2001, doi: 10.1046/j.0022-202x.2001.01368.x.
- [474] C.-Y. Cui *et al.*, “EDA targets revealed by skin gene expression profiles of wild-type, Tabby and Tabby EDA-A1 transgenic mice,” *Hum. Mol. Genet.*, vol. 11, no. 15, pp. 1763–1773, Jul. 2002, doi: 10.1093/hmg/11.15.1763.
- [475] H. He *et al.*, “Involvement of and interaction between WNT10A and EDA mutations in tooth agenesis cases in the Chinese population,” *PLoS One*, vol. 8, no. 11, p. e80393, 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0080393.
- [476] J. Hülsken, R. Vogel, B. Erdmann, G. Cotsarelis, and W. Birchmeier, “beta-Catenin controls hair follicle morphogenesis and stem cell differentiation in the skin,” *Cell*, vol. 105, no. 4, pp. 533–545, May 2001, doi: 10.1016/s0092-8674(01)00336-1.
- [477] Y. Zhang *et al.*, “Reciprocal requirements for EDA/EDAR/NF-kappaB and Wnt/beta-catenin signaling pathways in hair follicle induction,” *Dev. Cell*, vol. 17, no. 1, pp. 49–61, Jul. 2009, doi: 10.1016/j.devcel.2009.05.011.
- [478] J. Laurikkala *et al.*, “TNF signaling via the ligand-receptor pair ectodysplasin and edar controls the function of epithelial signaling centers and is regulated by Wnt and activin during tooth organogenesis,” *Dev. Biol.*, vol. 229, no. 2, pp. 443–455, Jan. 2001, doi: 10.1006/dbio.2000.9955.

- [479] M. C. Durmowicz, C. Y. Cui, and D. Schlessinger, “The EDA gene is a target of, but does not regulate Wnt signaling,” *Gene*, vol. 285, no. 1–2, pp. 203–211, Feb. 2002, doi: 10.1016/s0378-1119(02)00407-9.
- [480] S. J. Baker and E. P. Reddy, “Modulation of life and death by the TNF receptor superfamily,” *Oncogene*, vol. 17, no. 25, pp. 3261–3270, Dec. 1998, doi: 10.1038/sj.onc.1202568.
- [481] J. Vial *et al.*, “The Ectodysplasin receptor EDAR acts as a tumor suppressor in melanoma by conditionally inducing cell death,” *Cell Death Differ.*, vol. 26, no. 3, pp. 443–454, Mar. 2019, doi: 10.1038/s41418-018-0128-1.
- [482] H. Hsu, J. Xiong, and D. V. Goeddel, “The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation,” *Cell*, vol. 81, no. 4, pp. 495–504, May 1995, doi: 10.1016/0092-8674(95)90070-5.
- [483] P. K. Kim, A. S. Dutra, S. C. Chandrasekharappa, and J. M. Puck, “Genomic structure and mapping of human FADD, an intracellular mediator of lymphocyte apoptosis,” *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 157, no. 12, pp. 5461–5466, Dec. 1996.
- [484] H. Takada *et al.*, “Role of SODD in regulation of tumor necrosis factor responses,” *Mol. Cell. Biol.*, vol. 23, no. 11, pp. 4026–4033, Jun. 2003, doi: 10.1128/mcb.23.11.4026-4033.2003.
- [485] U. Gaur and B. B. Aggarwal, “Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily,” *Biochem. Pharmacol.*, vol. 66, no. 8, pp. 1403–1408, Oct. 2003, doi: 10.1016/s0006-2952(03)00490-8.
- [486] H. Wajant *et al.*, “Inhibition of death receptor-mediated gene induction by a cycloheximide-sensitive factor occurs at the level of or upstream of Fas-associated death domain protein (FADD),” *J. Biol. Chem.*, vol. 275, no. 32, pp. 24357–24366, Aug. 2000, doi: 10.1074/jbc.M000811200.
- [487] M. Priolo and C. Laganà, “Ectodermal dysplasias: a new clinical-genetic classification,” *J. Med. Genet.*, vol. 38, no. 9, pp. 579–585, Sep. 2001, doi: 10.1136/jmg.38.9.579.
- [488] A. R. Safa and K. E. Pollok, “Targeting the Anti-Apoptotic Protein c-FLIP for Cancer Therapy,” *Cancers*, vol. 3, no. 2, pp. 1639–1671, Jun. 2011, doi: 10.3390/cancers3021639.
- [489] O. Micheau, “Cellular FLICE-inhibitory protein: an attractive therapeutic target?,” *Expert Opin. Ther. Targets*, vol. 7, no. 4, pp. 559–573, Aug. 2003, doi: 10.1517/14728222.7.4.559.
- [490] M. Bagnoli, S. Canevari, and D. Mezzanzanica, “Cellular FLICE-inhibitory protein (c-FLIP) signalling: a key regulator of receptor-mediated apoptosis in physiologic context and in cancer,” *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 42, no. 2, pp. 210–213, Feb. 2010, doi: 10.1016/j.biocel.2009.11.015.
- [491] A. R. Safa, T. W. Day, and C.-H. Wu, “Cellular FLICE-like inhibitory protein (C-FLIP): a novel target for cancer therapy,” *Curr. Cancer Drug Targets*, vol. 8, no. 1, pp. 37–46, Feb. 2008, doi: 10.2174/156800908783497087.

- [492] N. Ueffing *et al.*, “A single nucleotide polymorphism determines protein isoform production of the human c-FLIP protein,” *Blood*, vol. 114, no. 3, pp. 572–579, Jul. 2009, doi: 10.1182/blood-2009-02-204230.
- [493] D. P. McLornan *et al.*, “Prognostic significance of TRAIL signaling molecules in stage II and III colorectal cancer,” *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.*, vol. 16, no. 13, pp. 3442–3451, Jul. 2010, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-0052.
- [494] G. J. Ullenhag, A. Mukherjee, N. F. S. Watson, A. H. Al-Attar, J. H. Scholefield, and L. G. Durrant, “Overexpression of FLIPL is an independent marker of poor prognosis in colorectal cancer patients,” *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.*, vol. 13, no. 17, pp. 5070–5075, Sep. 2007, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-06-2547.
- [495] P. Korkolopoulou *et al.*, “c-FLIP expression in bladder urothelial carcinomas: its role in resistance to Fas-mediated apoptosis and clinicopathologic correlations,” *Urology*, vol. 63, no. 6, pp. 1198–1204, Jun. 2004, doi: 10.1016/j.urology.2004.01.007.
- [496] W. Wang *et al.*, “The relationship between c-FLIP expression and human papillomavirus E2 gene disruption in cervical carcinogenesis,” *Gynecol. Oncol.*, vol. 105, no. 3, pp. 571–577, Jun. 2007, doi: 10.1016/j.ygyno.2007.01.051.
- [497] M.-B. Valnet-Rabier *et al.*, “c-Flip protein expression in Burkitt’s lymphomas is associated with a poor clinical outcome,” *Br. J. Haematol.*, vol. 128, no. 6, pp. 767–773, Mar. 2005, doi: 10.1111/j.1365-2141.2005.05378.x.
- [498] G. Valente *et al.*, “cFLIP expression correlates with tumour progression and patient outcome in non-Hodgkin lymphomas of low grade of malignancy,” *Br. J. Haematol.*, vol. 132, no. 5, pp. 560–570, Mar. 2006, doi: 10.1111/j.1365-2141.2005.05898.x.
- [499] X. Li *et al.*, “Overexpression of cFLIP in head and neck squamous cell carcinoma and its clinicopathologic correlations,” *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, vol. 134, no. 5, pp. 609–615, May 2008, doi: 10.1007/s00432-007-0325-7.
- [500] X. Du *et al.*, “Expression and biological significance of c-FLIP in human hepatocellular carcinomas,” *J. Exp. Clin. Cancer Res. CR*, vol. 28, p. 24, Feb. 2009, doi: 10.1186/1756-9966-28-24.
- [501] S. Y. Nam *et al.*, “Upregulation of FLIP(S) by Akt, a possible inhibition mechanism of TRAIL-induced apoptosis in human gastric cancers,” *Cancer Sci.*, vol. 94, no. 12, pp. 1066–1073, Dec. 2003, doi: 10.1111/j.1349-7006.2003.tb01402.x.
- [502] X.-D. Zhou, J.-P. Yu, J. Liu, H.-S. Luo, H.-X. Chen, and H.-G. Yu, “Overexpression of cellular FLICE-inhibitory protein (FLIP) in gastric adenocarcinoma,” *Clin. Sci. Lond. Engl. 1979*, vol. 106, no. 4, pp. 397–405, Apr. 2004, doi: 10.1042/CS20030238.
- [503] S. H. Lee *et al.*, “Increased expression of FLIP, an inhibitor of Fas-mediated apoptosis, in stomach cancer,” *APMIS Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.*, vol. 111, no. 2, pp. 309–314, Feb. 2003, doi: 10.1034/j.1600-0463.2003.1110203.x.

- [504] C. Haag *et al.*, “Identification of c-FLIP(L) and c-FLIP(S) as critical regulators of death receptor-induced apoptosis in pancreatic cancer cells,” *Gut*, vol. 60, no. 2, pp. 225–237, Feb. 2011, doi: 10.1136/gut.2009.202325.
- [505] C. McCourt *et al.*, “Elevation of c-FLIP in castrate-resistant prostate cancer antagonizes therapeutic response to androgen receptor-targeted therapy,” *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.*, vol. 18, no. 14, pp. 3822–3833, Jul. 2012, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-3277.
- [506] W. C. Yeh *et al.*, “Requirement for Casper (c-FLIP) in regulation of death receptor-induced apoptosis and embryonic development,” *Immunity*, vol. 12, no. 6, pp. 633–642, Jun. 2000, doi: 10.1016/s1074-7613(00)80214-9.
- [507] U. Testa, “TRAIL/TRAIL-R in hematologic malignancies,” *J. Cell. Biochem.*, vol. 110, no. 1, pp. 21–34, May 2010, doi: 10.1002/jcb.22549.
- [508] J. K. Yang, “FLIP as an anti-cancer therapeutic target,” *Yonsei Med. J.*, vol. 49, no. 1, pp. 19–27, Feb. 2008, doi: 10.3349/ymj.2008.49.1.19.
- [509] J. W. Yu and Y. Shi, “FLIP and the death effector domain family,” *Oncogene*, vol. 27, no. 48, pp. 6216–6227, Oct. 2008, doi: 10.1038/onc.2008.299.
- [510] M. Poukkula *et al.*, “Rapid turnover of c-FLIPshort is determined by its unique C-terminal tail,” *J. Biol. Chem.*, vol. 280, no. 29, pp. 27345–27355, Jul. 2005, doi: 10.1074/jbc.M504019200.
- [511] L. Chang *et al.*, “The E3 ubiquitin ligase itch couples JNK activation to TNFalpha-induced cell death by inducing c-FLIP(L) turnover,” *Cell*, vol. 124, no. 3, pp. 601–613, Feb. 2006, doi: 10.1016/j.cell.2006.01.021.
- [512] F.-Y. Li, P. D. Jeffrey, J. W. Yu, and Y. Shi, “Crystal structure of a viral FLIP: insights into FLIP-mediated inhibition of death receptor signaling,” *J. Biol. Chem.*, vol. 281, no. 5, pp. 2960–2968, Feb. 2006, doi: 10.1074/jbc.M511074200.
- [513] R. C. Budd, W.-C. Yeh, and J. Tschopp, “cFLIP regulation of lymphocyte activation and development,” *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 6, no. 3, pp. 196–204, Mar. 2006, doi: 10.1038/nri1787.
- [514] T. W. Day, S. Huang, and A. R. Safa, “c-FLIP knockdown induces ligand-independent DR5-, FADD-, caspase-8-, and caspase-9-dependent apoptosis in breast cancer cells,” *Biochem. Pharmacol.*, vol. 76, no. 12, pp. 1694–1704, Dec. 2008, doi: 10.1016/j.bcp.2008.09.007.
- [515] A. R. Safa, “c-FLIP, a master anti-apoptotic regulator,” *Exp. Oncol.*, vol. 34, no. 3, pp. 176–184, Oct. 2012.
- [516] J. Plati, O. Bucur, and R. Khosravi-Far, “Apoptotic cell signaling in cancer progression and therapy,” *Integr. Biol. Quant. Biosci. Nano Macro*, vol. 3, no. 4, pp. 279–296, Apr. 2011, doi: 10.1039/c0ib00144a.
- [517] D. B. Longley *et al.*, “c-FLIP inhibits chemotherapy-induced colorectal cancer cell death,” *Oncogene*, vol. 25, no. 6, pp. 838–848, Feb. 2006, doi: 10.1038/sj.onc.1209122.

- [518] A. E. Logan *et al.*, “In vitro and in vivo characterisation of a novel c-FLIP-targeted antisense phosphorothioate oligonucleotide,” *Apoptosis Int. J. Program. Cell Death*, vol. 15, no. 12, pp. 1435–1443, Dec. 2010, doi: 10.1007/s10495-010-0533-5.
- [519] H. Kinoshita, H. Yoshikawa, K. Shiiki, Y. Hamada, Y. Nakajima, and K. Tasaka, “Cisplatin (CDDP) sensitizes human osteosarcoma cell to Fas/CD95-mediated apoptosis by down-regulating FLIP-L expression,” *Int. J. Cancer*, vol. 88, no. 6, pp. 986–991, Dec. 2000, doi: 10.1002/1097-0215(20001215)88:6<986::aid-ijc23>3.0.co;2-b.
- [520] M. R. Abedini, E. J. Muller, J. Brun, R. Bergeron, D. A. Gray, and B. K. Tsang, “Cisplatin induces p53-dependent FLICE-like inhibitory protein ubiquitination in ovarian cancer cells,” *Cancer Res.*, vol. 68, no. 12, pp. 4511–4517, Jun. 2008, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-0673.
- [521] J. H. Song, D. K. Song, M. Herlyn, K. C. Petruk, and C. Hao, “Cisplatin down-regulation of cellular Fas-associated death domain-like interleukin-1beta-converting enzyme-like inhibitory proteins to restore tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis in human melanoma cells,” *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.*, vol. 9, no. 11, pp. 4255–4266, Sep. 2003.
- [522] A. El-Zawahry, J. McKillop, and C. Voelkel-Johnson, “Doxorubicin increases the effectiveness of Apo2L/TRAIL for tumor growth inhibition of prostate cancer xenografts,” *BMC Cancer*, vol. 5, p. 2, Jan. 2005, doi: 10.1186/1471-2407-5-2.
- [523] D. Chatterjee *et al.*, “Induction of apoptosis in 9-nitrocamptothecin-treated DU145 human prostate carcinoma cells correlates with de novo synthesis of CD95 and CD95 ligand and down-regulation of c-FLIP(short),” *Cancer Res.*, vol. 61, no. 19, pp. 7148–7154, Oct. 2001.
- [524] R. Yerbes and A. López-Rivas, “Itch/AIP4-independent proteasomal degradation of cFLIP induced by the histone deacetylase inhibitor SAHA sensitizes breast tumour cells to TRAIL,” *Invest. New Drugs*, vol. 30, no. 2, pp. 541–547, Apr. 2012, doi: 10.1007/s10637-010-9597-x.
- [525] D. M. Lucas *et al.*, “The novel deacetylase inhibitor AR-42 demonstrates pre-clinical activity in B-cell malignancies in vitro and in vivo,” *PLoS One*, vol. 5, no. 6, p. e10941, Jun. 2010, doi: 10.1371/journal.pone.0010941.
- [526] K. Bijangi-Vishehsaraei, S. Huang, A. R. Safa, M. R. Saadatzadeh, and M. P. Murphy, “4-(4-Chloro-2-methylphenoxy)-N-hydroxybutanamide (CMH) targets mRNA of the c-FLIP variants and induces apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells,” *Mol. Cell. Biochem.*, vol. 342, no. 1–2, pp. 133–142, Sep. 2010, doi: 10.1007/s11010-010-0477-7.
- [527] T. E. Wood *et al.*, “Selective inhibition of histone deacetylases sensitizes malignant cells to death receptor ligands,” *Mol. Cancer Ther.*, vol. 9, no. 1, pp. 246–256, Jan. 2010, doi: 10.1158/1535-7163.MCT-09-0495.
- [528] I. Murtaza, M. Saleem, V. M. Adhami, B. B. Hafeez, and H. Mukhtar, “Suppression of cFLIP by lupeol, a dietary triterpene, is sufficient to overcome resistance to TRAIL-mediated apoptosis in chemoresistant human pancreatic cancer cells,” *Cancer Res.*, vol. 69, no. 3, pp. 1156–1165, Feb. 2009, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-2917.

- [529] D. Hanahan and R. A. Weinberg, “The hallmarks of cancer,” *Cell*, vol. 100, no. 1, pp. 57–70, Jan. 2000, doi: 10.1016/s0092-8674(00)81683-9.
- [530] J. C. Reed, “Bcl-2-family proteins and hematologic malignancies: history and future prospects,” *Blood*, vol. 111, no. 7, pp. 3322–3330, Apr. 2008, doi: 10.1182/blood-2007-09-078162.
- [531] I. A. Voutsadakis, “Apoptosis and the pathogenesis of lymphoma,” *Acta Oncol. Stockh. Swed.*, vol. 39, no. 2, pp. 151–156, 2000, doi: 10.1080/028418600430707.
- [532] M. J. Rummel, S. de Vos, D. Hoelzer, H. P. Koefler, and W.-K. Hofmann, “Altered apoptosis pathways in mantle cell lymphoma,” *Leuk. Lymphoma*, vol. 45, no. 1, pp. 49–54, Jan. 2004, doi: 10.1080/1042819031000151112.
- [533] J. J. F. Muris, C. J. L. M. Meijer, G. J. Ossenkoppele, W. Vos, and J. J. Oudejans, “Apoptosis resistance and response to chemotherapy in primary nodal diffuse large B-cell lymphoma,” *Hematol. Oncol.*, vol. 24, no. 3, pp. 97–104, Sep. 2006, doi: 10.1002/hon.774.
- [534] L. Mazelin *et al.*, “Netrin-1 controls colorectal tumorigenesis by regulating apoptosis,” *Nature*, vol. 431, no. 7004, pp. 80–84, Sep. 2004, doi: 10.1038/nature02788.
- [535] P. Krimpenfort, J.-Y. Song, N. Proost, J. Zevenhoven, J. Jonkers, and A. Berns, “Deleted in colorectal carcinoma suppresses metastasis in p53-deficient mammary tumours,” *Nature*, vol. 482, no. 7386, pp. 538–541, Feb. 2012, doi: 10.1038/nature10790.
- [536] A. Boussouar *et al.*, “Netrin-1 and Its Receptor DCC Are Causally Implicated in Melanoma Progression,” *Cancer Res.*, vol. 80, no. 4, pp. 747–756, Feb. 2020, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-18-1590.
- [537] E. R. Fearon, “DCC: is there a connection between tumorigenesis and cell guidance molecules?,” *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1288, no. 2, pp. M17-23, Oct. 1996, doi: 10.1016/0304-419x(96)00023-6.
- [538] A. Fazeli *et al.*, “Phenotype of mice lacking functional Deleted in colorectal cancer (Dcc) gene,” *Nature*, vol. 386, no. 6627, pp. 796–804, Apr. 1997, doi: 10.1038/386796a0.
- [539] M. Krauthammer *et al.*, “Exome sequencing identifies recurrent somatic RAC1 mutations in melanoma,” *Nat. Genet.*, vol. 44, no. 9, pp. 1006–1014, Sep. 2012, doi: 10.1038/ng.2359.
- [540] E. Campo and S. Rule, “Mantle cell lymphoma: evolving management strategies,” *Blood*, vol. 125, no. 1, pp. 48–55, Jan. 2015, doi: 10.1182/blood-2014-05-521898.
- [541] P. Mehlen, C. Delloye-Bourgeois, and A. Chédotal, “Novel roles for Slits and netrins: axon guidance cues as anticancer targets?,” *Nat. Rev. Cancer*, vol. 11, no. 3, pp. 188–197, Mar. 2011, doi: 10.1038/nrc3005.
- [542] F. Larrieu-Lahargue *et al.*, “Blocking Fibroblast Growth Factor Receptor Signaling Inhibits Tumor Growth, Lymphangiogenesis, and Metastasis,” *PLoS ONE*, vol. 7, no. 6, Jun. 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0039540.

- [543] K. Yin *et al.*, “Netrin-1 promotes metastasis of gastric cancer by regulating YAP activity,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 496, no. 1, pp. 76–82, 29 2018, doi: 10.1016/j.bbrc.2017.12.170.
- [544] A. Sadier, L. Viriot, S. Pantalacci, and V. Laudet, “The ectodysplasin pathway: from diseases to adaptations,” *Trends Genet. TIG*, vol. 30, no. 1, pp. 24–31, Jan. 2014, doi: 10.1016/j.tig.2013.08.006.
- [545] S. Lefebvre and M. L. Mikkola, “Ectodysplasin research--where to next?,” *Semin. Immunol.*, vol. 26, no. 3, pp. 220–228, Jun. 2014, doi: 10.1016/j.smim.2014.05.002.
- [546] D. Belharazem *et al.*, “cFLIP overexpression in T cells in thymoma-associated myasthenia gravis,” *Ann. Clin. Transl. Neurol.*, vol. 2, no. 9, pp. 894–905, Sep. 2015, doi: 10.1002/acn3.210.
- [547] L. Kleinesudeik, K. Rohde, and S. Fulda, “Regulation of the antiapoptotic protein cFLIP by the glucocorticoid Dexamethasone in ALL cells,” *Oncotarget*, vol. 9, no. 23, pp. 16521–16532, Mar. 2018, doi: 10.18632/oncotarget.24782.
- [548] D. McLornan *et al.*, “Prognostic and therapeutic relevance of c-FLIP in acute myeloid leukaemia,” *Br. J. Haematol.*, vol. 160, no. 2, pp. 188–198, Jan. 2013, doi: 10.1111/bjh.12108.
- [549] J. Harris, H. Ibrahim, F. Amen, A. Karadimitris, K. N. Naresh, and D. H. Macdonald, “Cellular (FLICE) like inhibitory protein (cFLIP) expression in diffuse large B-cell lymphoma identifies a poor prognostic subset, but fails to predict the molecular subtype,” *Hematol. Oncol.*, vol. 30, no. 1, pp. 8–12, Mar. 2012, doi: 10.1002/hon.996.