



HAL
open science

Implication de deux partenaires de DCC dans le développement et la tumorigenèse

Marion Creveaux

► **To cite this version:**

Marion Creveaux. Implication de deux partenaires de DCC dans le développement et la tumorigenèse. Cancer. Université de Lyon, 2016. Français. NNT : 2016LYSE1171 . tel-03510202

HAL Id: tel-03510202

<https://theses.hal.science/tel-03510202v1>

Submitted on 4 Jan 2022

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



N°d'ordre NNT : 2016LYSE171

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale 340
Biologie Moléculaire Intégrative et Cellulaire

Soutenue publiquement le 04/10/2016, par :
Marion Creveaux

Implication de deux partenaires de DCC dans le développement et la tumorigenèse

Devant le jury composé de :

Arrigo Patrick	Pr Emérite, UCBL, Lyon	Président
Ayrault Olivier	CR1, Institut Curie, Paris	Rapporteur
Castets Perrine	Ambizione Fellow, Bâle	Examinatrice
Gongora Céline	DR2, IRCM, Montpellier	Rapporteur
Ruggiero Florence	DR2, IGFL, Lyon	Examinatrice
Castets Marie	CR1, CRCL, Lyon	Directrice de thèse

Index des abréviations

ADAM : A disintegrin And Metalloprotease
ADAMTS : A disintegrin And Metalloprotease with thrombospondin repeat
ADAMTSL : A disintegrin And Metalloprotease with thrombospondin repeat Like
ADD : Addiction Dependence Domain
APAF-1 : Apoptotic Protease Factor 1
APP : Amyloid precursor protein
ATL1 : A Disintegrin and Metalloprotease with thrombospondin repeat Like 1
ATL3 : A Disintegrin and Metalloprotease with thrombospondin repeat Like 3
Bcl-2 : B-cell lymphoma 2
Bcl-6 : B-cell lymphoma 6
BCR : B-Cell Receptor
BMP : bone morphogenetic protein
CAD : Caspase Activated DNase
CARD : Caspase Activation and Recruitment Domain
CDON : cell-adhesion molecule-related/downregulated by oncogenes
CED : Cell Death abnormal
CG : Centre germinatif
CS : chondroïtine sulfate
DCC : Deleted in Colorectal Carcinoma
DD : Death Domain
DED : Death Effector Domain
DISC : Death-Induced Signaling Complex
DS : dermatane sulfate
FACITs : Fibril Associated Collagens with Interrupted Triple helices
FADD : Fas-Associated Death Domain
FLIP : Flice-Like Inhibitory Protein
Fra : Frazzled
GAG : glycosaminoglycanes
GLI : Glioma-associated transcription factor
HA : acide hyaluronique
HARE : HA receptor for endocytosis
HMS : hypermutation somatique
KS : keratane sulfate
LCB : Lymphome à cellule B
LDGC-B : Lymphome diffus à grandes cellules B
LB : Lymphocyte B
LCM : Lymphome à cellule du manteau
LH/LNH : Lymphome de Hodgkin / Lymphome non Hodgkinien
LPEB : Lymphome primaire extra-nodal à cellule B
LT : Lymphocyte T

MADD-4 : Muscle Arm development Defective 4
MEC : Matrice Extracellulaire
MMP : matrix métalloprotéase
MOMP : Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization
NCAM : Neural Cell Adhesion Molecule
NGF : Nervous Growth Factor
NK : Natural Killer
NT-3 : Neurotrophine 3
PCNSL : Primary Central Nervous System Lymphoma
PG : protéoglycanes
PPRL : petit protéoglycane riche en leucine
Ptc : Patched 1
PTCL-NOS : Peripheral T-Cell Lymphoma-Non Otherwise Specified
RD : Récepteur à Dépendance
RIPK1/3 : Receptor-Interacting Ser/Thr Protein Kinase 1/3
RMS : rhabdomyosarcome
RTK : Récepteur à tyrosine kinase
RTP : Récepteur à tyrosine phosphatase
Shh : Sonic hedgehog
SMO : Smoothened
SVZ : Zone sub-ventriculaire
TCR : T-Cell Receptor
TGF β : Transforming Growth Factor β
TIMP : tissue inhibitor of metalloproteinase
TMA : Tumor MicroArray
TNF : Tumor Necrosis Factor
TNFR1 : Tumor Necrosis Factor Receptor 1
TRAIL : TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand
UNC : Uncoordinated

Table des matières

I.	La mort cellulaire : enjeux, mécanismes et dysfonctionnements	2
1.	Approche historique	2
2.	Les différents types de mort cellulaire : manifestations et mécanistique.....	4
2.1.	L'apoptose	5
2.2.	L'autophagie	9
2.3.	La nécrose.....	11
3.	Rôles physiologiques et pathologiques de la mort cellulaire	12
3.1.	Rôle physiologique de la mort cellulaire	12
3.2.	Dérégulation de la mort cellulaire et pathologies.....	14
II.	Des récepteurs membranaires aux récepteurs à dépendance : les acteurs de la mort cellulaire.....	17
1.	Les récepteurs membranaires et l'intégration des signaux extracellulaires	17
1.1.	Approche historique de la notion de récepteurs.....	17
1.2.	Généralités sur les récepteurs membranaires	18
2.	Les récepteurs membranaires et la régulation de la mort cellulaire	20
2.1.	Les récepteurs de mort : acteurs clés de la voie extrinsèque	20
2.2.	Les récepteurs à neurotrophines et la Théorie Neurotrophique.....	22
3.	Les Récepteurs à Dépendance : un nouveau paradigme dans la régulation de la mort cellulaire.....	23
3.1.	Caractéristiques fonctionnelles des RD	23
3.2.	Modalités de la signalisation apoptotique induite par les RD	25
3.3.	Rôle des RD dans le développement embryonnaire	26
3.4.	Le côté sombre des RD : dérégulation de la signalisation apoptotique dans les cancers	28
4.	DCC : entre développement neuronal et tumorigenèse	30
4.1.	Généralités.....	30
4.2.	DCC : entre suppresseur de tumeur et facteur de guidage axonal, l'objet d'une controverse	30
4.3.	Le couple DCC/nétrine-1 potentielle cible thérapeutique ?	35

RESULTATS

Partie I : Implication du couple nétrine-1/DCC dans la survenue de lymphomes à cellules B

I.	Qu'est-ce qu'un lymphome ?.....	39
1.	Généralités	39
2.	Les lymphomes à cellules T (LCT)	40

3. Les lymphomes à cellules B (LCB)	40
3.1. Généralités.....	40
3.2. Quelques exemples de LCB	43
4. Hypothèses et objectifs	47
5. Présentation des résultats	47
5.1. Implication du couple nétrine-1/DCC dans le développement de lymphomes diffus à grandes cellules B et de lymphomes du manteau	47
5.2. Rôle du couple DCC/nétrine-1 dans les lymphomes extra-nodaux.....	49
Partie II : Caractérisation fonctionnelle d'ADAMTSL1, partenaire potentiel de DCC	
1. La matrice extracellulaire (MEC)	60
1.1. Présentation générale.....	60
1.2. Composition et rôles de la MEC.....	61
2. Caractérisation fonctionnelle d'ADAMTSL1 : état des connaissances et hypothèse de travail	73
2.1. MADD-4 orthologue de ADAMTSL1/3, un nouveau facteur de guidage pour UNC-40	73
2.2. D'une protéine matricielle à un partenaire possible de DCC : hypothèses de travail.....	74
3. Résultats	75
3.1. Matériel et méthodes	75
3.2. Expression d'ADAMTSL1 dans le cancer colorectal.....	78
3.3. Etude de l'existence d'une interaction physique et fonctionnelle entre DCC et les protéines ADAMTSL1 et 3.....	79
3.4. Analyse du rôle d'ADAMTSL1 comme protéine matricielle : étude d'un modèle murin	83
3.5. Implication d'ADAMTSL1 dans la voie du TGF β	93

DISCUSSION

I. Partie 1 : Implication du couple nétrine-1/DCC dans la survenue de lymphomes à cellules B	97
1. La signalisation apoptotique de DCC : modalités, blocage et tumorigenèse	97
1.1. DCC, un suppresseur de tumeur conditionnel et ubiquitaire ?.....	97
1.2. Modalités de la signalisation apoptotique de DCC : vers l'identification de nouveaux acteurs de la tumorigenèse	98
1.3. DCC/nétrine-1 : nouvelles cibles dans la prise en charge des lymphomes à cellules B ?.....	99
1.4. Place du couple DCC/nétrine-1 dans les lymphomes extra-nodaux	100
II. Partie 2 : Caractérisation fonctionnelle d'ADAMTSL1, partenaire potentiel de DCC	102
1. DCC et ADAMTSL1/3, faut-il vraiment abandonner cette piste ?.....	102

2. Implication d'ADAMTSL1 dans les tissus musculaires et cartilagineux.....	104
2.1. ATL1 est-elle impliquée dans la régénération musculaire ?.....	104
2.2. ATL1, régulateur de la mise en place/ du remodelage du cartilage ?	106
2.3. ATL1, signalisation et transcrits	107
3. Implication d'ADAMTSL1 dans la tumorigenèse	107

INTRODUCTION

Avant-propos

Si la mort est perçue dans notre société moderne comme une fatalité tragique, elle est à considérer avec un tout autre regard à l'échelle d'un organisme. Chaque jour, un adulte perd par exemple entre 50 et 70 milliards de cellules, avec comme enjeu ultime et paradoxal, le maintien de l'intégrité physique de l'individu. L'homéostasie des tissus repose en réalité sur un équilibre très fin entre vie et mort cellulaire, dès les premiers instants de vie. La mitose, division cellulaire, est contrebalancée par l'élimination de cellules, afin de maintenir leur nombre constant. La survie des cellules dépend de la présence dans l'environnement de signaux pouvant être biochimiques-comme les facteurs de croissance et les cytokines-ou biomécaniques, tel que l'ancrage à la matrice extracellulaire (Partie 2, paragraphe 1). Ces divers stimuli sont détectés par des récepteurs transmembranaires (Introduction, paragraphe 1), cytoplasmiques ou nucléaires puis analysés par la cellule. Une absence de facteurs de croissance dans le milieu environnant, la présence d'un ADN endommagé ou encore l'infection par un virus peuvent conduire à l'induction de la mort cellulaire afin d'éviter qu'une cellule surnuméraire ou potentiellement dangereuse ne se multiplie davantage (Introduction, paragraphe 2).

Nous nous intéresserons dans un premier temps aux différents types de mort cellulaire (apoptose, mort par autophagie et nécrose) en définissant leurs caractéristiques morphologiques et mécanistiques. Puis nous nous focaliserons sur les récepteurs membranaires, senseurs indispensables à la détection des signaux externes, pouvant déclencher la mort. Nous décrirons enfin une catégorie particulière de récepteurs membranaires : les récepteurs à dépendance dont le membre le mieux décrit, DCC, est l'objet du travail de cette thèse.

I. La mort cellulaire : enjeux, mécanismes et dysfonctionnements

1. Approche historique

Dès l'antiquité, Claude Galien, médecin grec, observa que certaines structures embryonnaires comme le canal artériel, permettant au sang de l'artère pulmonaire de rejoindre l'aorte sans passer par les poumons, disparaissaient après la naissance (Biologie de la mort, Klarsfeld et Revah). A l'époque, la notion de cellule n'existant pas encore, il fallut attendre 1839 et la « théorie cellulaire », l'avènement de la microscopie ainsi que l'invention des premiers microtomes pour que les biologistes fassent le lien entre la régression de certaines structures et la mort cellulaire. Dès la première moitié du 19^e siècle, la mort cellulaire, particulièrement dans le cadre de la métamorphose animale des Insectes et des Amphibiens commença à être évoquée. En 1842, Carl Vogt rapporta que chez le crapaud *Alytes obstetricans* les cellules de la notochorde sont « détruites » et « disparaissent » pour être remplacées par les cellules cartilagineuses adjacentes qui,

elles, prolifèrent. En 1863, August Weisman nota que chez la puppe de diptère, différentes structures larvaires disparaissent pendant la métamorphose et que de nombreuses cellules meurent dans le système nerveux. Il baptisa ce phénomène l'histolyse (Clarke et Clarke 1996).

A l'échelle cellulaire, apparaissent dans la bibliographie les premières descriptions morphologiques de cellules mortes : au début des années 1900, Gomez et Pike observent dans les cellules nerveuses une dégradation de la chromatine, une vacuolisation du cytoplasme, fracture du protoplasme, gonflement ou encore un « effondrement » de la cellule par exemple après une période d'anémie dans le système nerveux central (Gomez et Pike 1909). Ces premières analyses ne correspondent pas en réalité à un type de mort cellulaire unique mais recouvrent l'ensemble des différents types de morts cellulaires connues à ce jour, à savoir la nécrose, l'apoptose et même la mort autophagique. Jusqu'au début des années 1960, seule la nécrose, mort cellulaire rapide et dégénérative permettant de convertir une cellule en un amas de débris et donnant lieu à une morphologie tissulaire altérée, avait été caractérisée par les pathologistes avec ses manifestations macroscopiques, comme un exsudat noir ou l'apparition d'un membre gangréneux. Au début de cette décennie, John Kerr fut le premier à distinguer un type de mort différent de la nécrose. Il observa en effet dans la glande surrénale de rat, un processus affectant des cellules isolées et sans inflammation, laissant les organelles comme les mitochondries intactes, autrement dit, contrairement à la nécrose, une mort non-dégénérative. Grâce à la microscopie électronique, il décrivit ce qu'il qualifia alors de « nécrose contractile », caractérisée par une condensation du cytoplasme et de la chromatine ainsi que la formation de corps apoptotiques, [Figure 1](#) (J. F. R. Kerr 2002). De plus en plus d'exemples de l'implication de ce type de mort dans l'homéostasie des tissus furent répertoriés à cette époque-là, rassemblées sous le terme de « nécrobiose », mort physiologique particulièrement conservatrice puisqu'elle peut être massive sans endommager les tissus.

Ce n'est que plus tard qu'elle prendra son terme définitif d' « apoptose », du grec apo- (loin) et ptosis (tomber), faisant référence à la chute des feuilles en automne ou des pétales de fleurs (J. F. Kerr, Wyllie, et Currie 1972). A la même époque, Schweichel et al., décrivirent au cours du développement, un dernier type de mort cellulaire, caractérisé par la formation de vacuoles (Schweichel et Merker 1973). C'est la première description de la mort par autophagie, qui se caractérise par l'apparition de larges vésicules intracellulaires et un engagement de la machinerie autophagique.

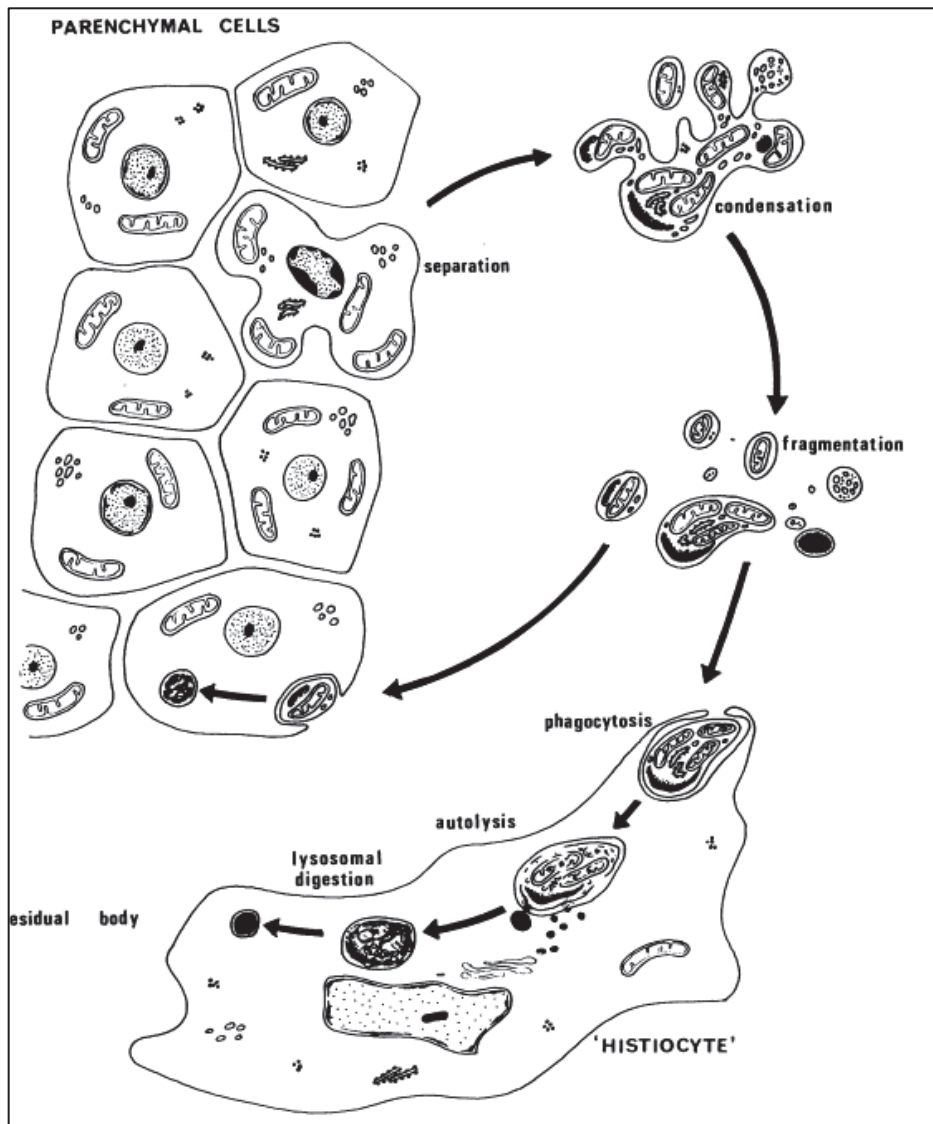


Figure 1 : Schéma de la caractérisation morphologique de l'apoptose, extrait de l'article de Kerr, Wyllie et Currie (Kerr, 1972). Ce type de mort cellulaire se caractérise tout d'abord par une dissociation des cellules les unes des autres, une condensation du cytoplasme suivi d'une fragmentation formant ainsi les corps apoptotiques. Ces derniers seront éliminés par phagocytose.

2. Les différents types de mort cellulaire : manifestations et mécanistique

On distingue aujourd'hui trois grands types de mort cellulaire, caractérisés notamment par l'apparence que prennent les cellules mourantes :

- l'apoptose (mort de type I),
- la mort cellulaire autophagique (mort de type II),
- et enfin la nécrose (mort de type III).

Cependant, des subtilités existent avec la description en 2005 de la nécroptose, mort cellulaire combinant, comme son nom l'indique, des caractéristiques de la nécrose et de l'apoptose.

2.1. L'apoptose

2.1.1. Présentation générale

L'apoptose est une forme de mort dite « programmée », puisque c'est la cellule elle-même qui, en réponse à certains signaux, enclenche ou non un processus suicidaire. L'apoptose se caractérise au niveau phénotypique par une contraction globale des cellules : celles-ci se désolidarisent les unes des autres, s'arrondissent et se détachent de la matrice extracellulaire (MEC). Ces événements, dus notamment à un remodelage du cytosquelette, sont associés à un bourgeonnement de la membrane plasmique, sur laquelle apparaissent des protrusions.

Au niveau nucléaire, on observe une condensation du noyau et de la chromatine, appelée pycnose, qui est irréversible. L'ADN est ensuite fragmenté par une enzyme, la protéine CAD (Caspase Activated DNase), qui clive la molécule aux endroits où elle est accessible, au niveau des nucléosomes. La cellule se fragmente alors en « corps apoptotiques », toujours reliés à la membrane plasmique et contenant des organelles cytoplasmiques, des fragments nucléaires et autres débris cellulaires (Häcker 2000). Les phosphatidylsérines, en temps normal exposées sur la face interne de la membrane plasmique, vont être basculées du côté cytoplasmique, ce qui envoie un signal indiquant que la cellule doit être phagocytée aux cellules environnantes. Les corps apoptotiques générés peuvent alors être digérés par des cellules du système immunitaire, les macrophages, ou par les cellules épithéliales alentour, ce qui permet à la fois d'éviter une réaction inflammatoire et de recycler les composants organiques de la cellule mourante.

2.1.2. Mécanistique

a) Les caspases, protéines effectrices centrales de l'apoptose

La dissection des mécanismes de transduction de la signalisation apoptotique a été initiée chez le nématode *C. elegans* à partir de l'étude de neuf mutants différents, baptisés CED pour Cell Death abnormal, dans lesquels la mort cellulaire programmée est ineffective. C'est ainsi que fut découverte la caspase CED-3, une cystéine protéase nécessaire à l'exécution de la mort cellulaire chez *C. elegans* (Yuan et al. 1993). Le mutant CED-3 présente des cellules surnuméraires mais possède une morphologie et un comportement similaires à celui d'un ver sauvage.

Le génome humain compte 11 gènes codant pour des caspases, pouvant cliver plus de 1000 substrats différents. Les deux voies de signalisation apoptotiques, intrinsèque ou extrinsèque (voir paragraphe 2-1-2 b), convergent toutes deux à la mort cellulaire par activation des caspases.

Les caspases contiennent, côté N-terminal l'un des deux domaines caractéristiques de ces enzymes, le domaine CARD (Caspase Recruitment Domain) ou le domaine DED (Death

Effector Domain) puis, en progressant du côté C-terminal, une sous-unité large p20 et une sous-unité courte p10 (Figure 2). Les domaines CARD et DED permettent aux caspases sous forme inactive appelée zymogène d'être recrutées sur les complexes d'activation apoptotique (J. Li et Yuan 2008). Après clivage au niveau du domaine CARD/DED et entre les unités p20 et p10, des dimères p20/p10 actifs se forment et s'assemblent ensuite en hétérotétramères actifs de façon antiparallèle. Si les caspases 1, 4, 5, 11 et 12 sont des caspases pro-inflammatoires régulant la maturation des cytokines, les caspases impliquées dans l'apoptose peuvent quant à elles être divisées en deux catégories :

- les caspases initiatrices (2, 8 et 9), qui sont activées en début d'apoptose. Ces caspases sont très spécifiques et possèdent seulement quelques substrats chacune, en plus de leur capacité à cliver des caspases effectrices ;
- les caspases effectrices (3, 6 et 7), clivées et activées par les caspases initiatrices (sauf pour la caspase 6 qui peut être clivée par la caspase 3 et 7), qui vont à leur tour pouvoir cliver leurs substrats respectifs, conduisant à la phase finale de l'apoptose et donc au démantèlement de la cellule. Elles sont notamment responsables de la fragmentation de l'ADN en activant la protéine CAD par clivage de son inhibiteur iCAD (Salvesen 2002).

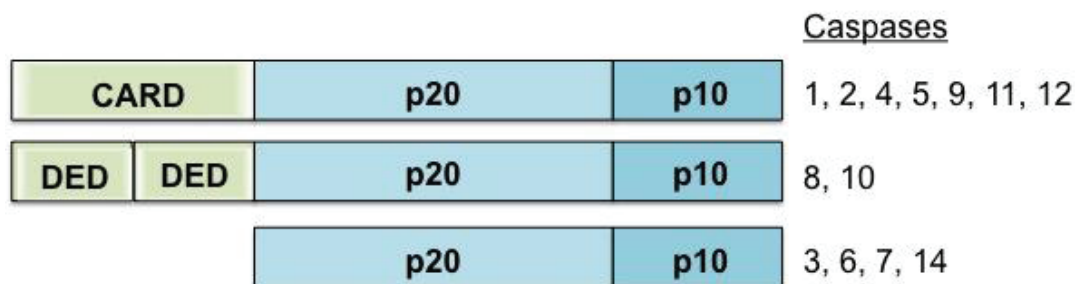


Figure 2 : Structure et organisation des caspases humaines (Figure originale). Les domaines CARD et DED permettent aux caspases d'être recrutées sur les complexes d'initiation. La grande sous-unité p20 et la petite sous-unité p10 s'assemblent en hétérotétramère actif après clivage. On distingue les caspases initiatrices (2, 8 et 9), les caspases effectrices (3, 6 et 7) et les caspases pro-inflammatoires (1, 4, 5, 11 et 12).

b) Les voies de signalisation apoptotiques

b-1) La voie intrinsèque

La voie intrinsèque, encore appelée voie mitochondriale, est le mécanisme de transduction apoptotique le plus répandu chez les Vertébrés. Elle est initiée de manière autonome par chaque cellule sous l'effet de facteurs, tels que les dommages à l'ADN, une privation en facteurs de croissance ou un stress du réticulum endoplasmique. Ces stimuli déclenchent la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe, phénomène qualifié de MOMP (Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization) provoquant ainsi le relargage dans le cytosol de facteurs apoptotiques (cytochrome c, Smac ou Diablo). La

perméabilisation de la membrane mitochondriale est contrôlée par les protéines de la famille Bcl-2 (B-Cell Lymphoma 2). On distinguera :

- les protéines pro-apoptotiques (Bax, Bak), s'associant en pores multimériques dans la membrane mitochondriale après activation par les protéines activatrices de la famille BH3 (Bid, Bim et Puma). En réponse à un stimuli apoptotique, Bid, Bim et Puma sont activées et provoquent, par interaction directe, un changement de conformation de Bax et Bak.
- les protéines anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-XL, MCL-1) qui inhibent l'apoptose en séquestrant les BH3 activatrices.

Certaines protéines de la famille BH3 (Bad, Noxa) sont dites sensibilisantes, puisqu'elles peuvent se lier aux Bcl-2 apoptotiques, libérant ainsi les BH3 activatrices (Hata, Engelman, et Faber 2015).

Le relargage du cytochrome c dans le cytosol, conduit à la formation d'un complexe appelé apoptosome comprenant, outre le cytochrome c, la protéine APAF1 (Activating Protease Activating Factor 1) et la caspase 9. Le domaine CARD de cette dernière interagit avec le domaine CARD d'APAF1, permettant ainsi aux monomères inactifs de caspase 9 de se retrouver dans une grande proximité et ainsi de s'auto-cliver. Cette cystéine protéase initiatrice, spécifique de la voie mitochondriale, va alors à son tour cliver et activer les caspases effectrices 3 et 7.

b-2) La voie extrinsèque

Par opposition à la voie mitochondriale, la voie des récepteurs de mort est appelée voie extrinsèque puisqu'elle est activée par des signaux extérieurs à la cellule. Cette signalisation dépend de la perception de signaux extérieurs par des récepteurs, appelés récepteurs de mort dont les caractéristiques seront exposées au paragraphe II-2-a. La signalisation apoptotique des récepteurs de mort est particulièrement nécessaire à l'immunité. Le couple Fas/FasL par exemple permet l'élimination des lymphocytes T matures activés après une réponse immunitaire ou encore la destruction par les cellules cytotoxiques de cellules infectées par un virus. La signalisation du couple TNFR1 (Tumor Necrosis Factor Receptor 1)/TNF (Tumor Necrosis Factor) est quant à elle activée en réponse à une infection (Ashkenazi et Dixit 1998). Les récepteurs de mort (Fas, TRAIL-R ou TNFR1) contiennent un domaine de mort DD (Death Domain) dans leur région intracellulaire. En réponse à un stimuli, un complexe protéique est recruté *via* le DD ce qui aboutit ainsi à l'activation de la caspase 8 qui à partir de ce moment pourra activer par clivage les caspases effectrices 3 et 7.

b-3) Anoikis

L'anoikis, du grec « sans maison », est une forme de mort cellulaire de type apoptotique induite en cas de détachement d'une cellule à la matrice extracellulaire. Elle permet ainsi d'éviter la colonisation d'un organe distant par une cellule qui se serait détachée de son substrat. Ce type particulier d'apoptose, déclenché lorsque les récepteurs cellulaires de

type intégrines ne sont plus connectés à un substrat, fait intervenir à la fois la voie intrinsèque et la voie extrinsèque. En condition physiologique, c'est-à-dire lorsqu'elles sont liées aux protéines de la MEC, les intégrines activent différentes molécules comme FAK, Src, ainsi que les voies PI3K/Akt ou MAPK favorisant ainsi la survie cellulaire. Au contraire, le détachement de la cellule de son substrat induit la voie intrinsèque par activation des protéines Bid et Bim ainsi que la voie extrinsèque par activation de la voie Fas/FasL et la diminution d'expression de la protéine FLIP.

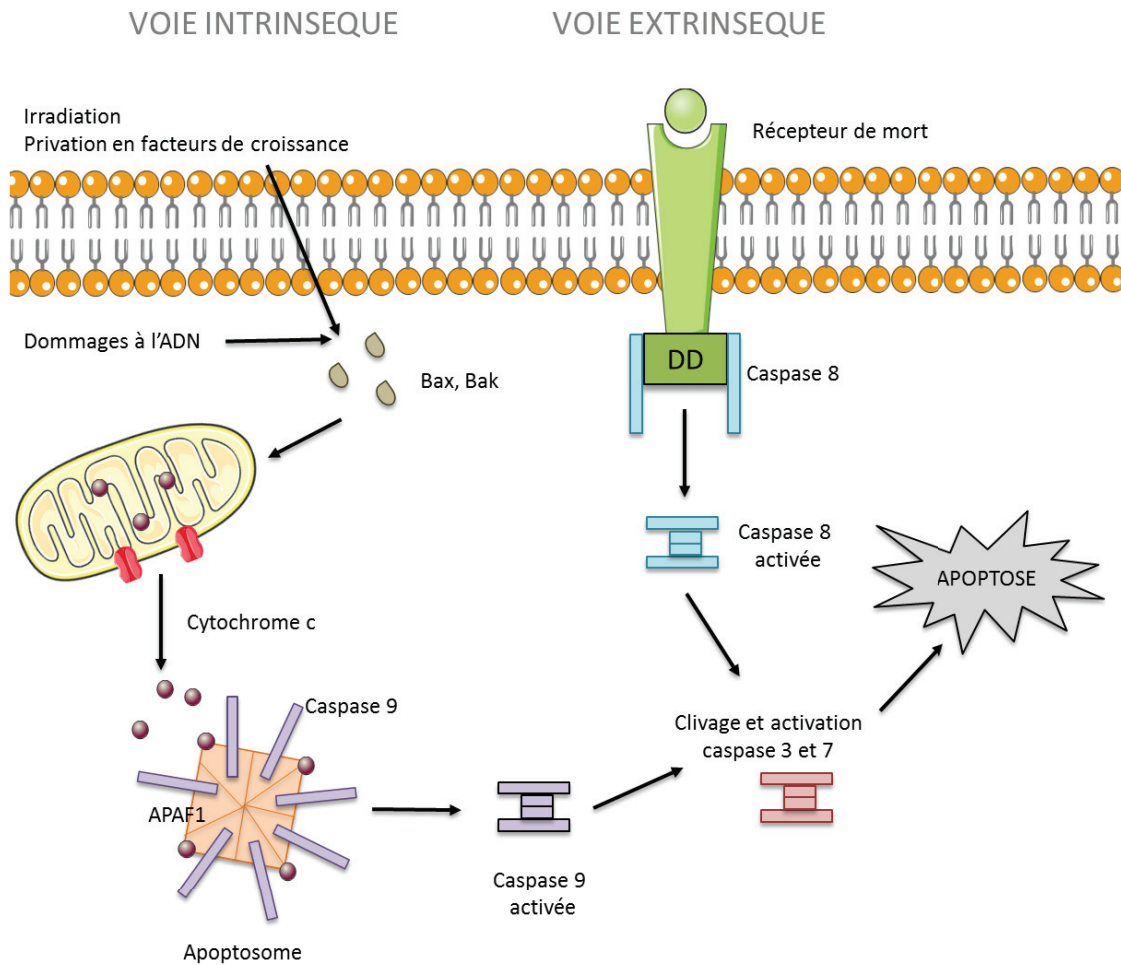


Figure 3 : Représentation schématique des deux voies, intrinsèque et extrinsèque conduisant à l'apoptose par activation des caspases (Figure originale). Les stimuli déclenchant la voie mitochondriale induisent l'activation de Bax et Bak, qui vont s'oligomériser et former un pore dans la membrane mitochondriale, induisant le relargage du cytochrome c puis l'activation de la caspase 9 au niveau de l'apoptosome. La fixation d'un ligand sur un récepteur de mort induit le recrutement et l'activation de la caspase 8.

2.2. L'autophagie

2.2.1. Présentation générale

L'autophagie est un processus engagé en cas de stress métabolique et notamment en cas de carence en nutriments, d'absence de facteurs de croissance ou d'hypoxie. En effet, ce type de mort cellulaire permet alors de rendre disponibles des substrats énergétiques par dégradation partielle des constituants du cytoplasme. Elle permet également de débarrasser la cellule de certains déchets comme les agrégats protéiques ou les mitochondries ayant un potentiel de membrane trop faible. Elle joue également un rôle majeur dans l'immunité puisqu'elle permet la dégradation des pathogènes intracellulaires et la génération de peptides pouvant être présentés au Complexe Majeur d'Histocompatibilité. La séquestration des organites a lieu dans des vacuoles à double membrane, les autophagosomes, qui fusionnent après leur formation avec les lysosomes cytoplasmiques, formant ainsi les autolysosomes.

Le terme « mort par autophagie » est controversé car certains décrivent l'autophagie comme une stratégie d'adaptation en cas de stress visant initialement à favoriser la survie, plutôt que comme un élément déclencheur de la mort cellulaire (Kroemer et Levine 2008). En ce sens, les cellules de mammifères invalidées pour les gènes Atg (Autophagy related genes) de l'autophagie présentent en effet une mort cellulaire plus importante en cas de stress induit par retrait de facteurs de croissance ou privation en sérum.

Il existe cependant de plus en plus de situations dans lesquelles il a été montré que la machinerie autophagique induit une forme particulière de mort cellulaire, qui s'apparente à un processus d'auto cannibalisme, aboutissant à la destruction de cellules endommagées. Dans d'autres cas, l'autophagie précède l'apoptose ou la nécrose cellulaire.

2.2.2. Mécanistique

L'autophagie est un processus désignant la dégradation partielle ou totale du cytoplasme de la cellule par ses propres lysosomes.

Le déclenchement de l'autophagie est régulé par deux protéines au fonctionnement antagoniste. Dans un contexte cellulaire « normal », mTORC1 va inhiber la structuration du complexe de pré-initiation de l'autophagie, composé des protéines ULK1, FIP200 et Atg13. En revanche, en cas de stress métaboliques et notamment de manque d'ATP, mTORC1 est inhibée, la protéine AMPK est activée ce qui favorise la formation du complexe de pré-initiation. Ce dernier stimule alors la mise en place du complexe d'initiation contenant les protéines Beclin-1, Vps34 et Vps15. L'autophagie est enclenchée et commence par la formation du phagophore, structure à double membrane en forme de demi-lune qui se formerait, d'après le consensus actuel *de novo* à partir de membrane du réticulum endoplasmique. Vont ensuite se dérouler une suite d'événements séquentiels faisant intervenir les protéines de la famille Atg, spécifiques de l'autophagie, permettant l'élongation puis la fermeture du phagophore, donnant ainsi naissance à

l'autophagosome. L'étape ultime est la fusion de l'autophagosome avec un lysosome formant alors un autolysosome, dans lequel le matériel séquestré va être dégradé puis relargué dans le cytoplasme, afin de servir à de nouveaux processus cellulaires comme la production d'énergie (Kroemer et Levine 2008). Il est intéressant de noter que les protéines décrites dans un contexte où l'autophagie va être enclenchée pour favoriser la survie, comme en cas de manque de nutriments, sont les mêmes que celles décrites dans les cas de mort autophagique (Atg5, Atg6 et Atg7). La différence réside plutôt dans leur niveau et leur cinétique d'expression (Tsujiimoto et Shimizu 2005).

Lors de l'involution de la glande salivaire de la drosophile, inhiber les protéines Atg réduit la mort cellulaire associée à ce phénomène et alors que réciproquement, surexprimer l'orthologue d'Atg1, ULK1, suffit à déclencher la mort autophagique. Il a également été décrit récemment dans une lignée cellulaire de mammifère constitutivement activée pour H-Ras que certaines protéines impliquées dans l'autophagie « classique » comme Atg7 ou Beclin1 pourraient être nécessaires à la mort non-apoptotique (Yu et al. 2004).

Il est intéressant de noter qu'il existe des interactions moléculaires entre l'apoptose et l'autophagie. En effet, il a par exemple été démontré que certains membres de la famille Bcl-2 peuvent réguler le complexe d'initiation : les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-xl peuvent ainsi séquestrer Beclin-1. En cas de stress, la protéine apoptotique Bad permet le relargage de Beclin-1 qui peut alors participer au complexe d'initiation. La phosphorylation de Beclin-1 par la protéine DAPK (death-associated protein kinase) permet alternativement de dissocier la protéine de Bcl-2 et Bcl-xl (Douglas R. Green et Llambi 2015). Les interactions entre l'apoptose et l'autophagie sont d'autant plus complexes qu'on retrouve d'autres protéines que celles de la famille Bcl-2 à la croisée des deux voies de signalisation. Ainsi la protéine anti-apoptotique FLIP, capable d'inhiber la caspase 8, pourrait également jouer le rôle de régulateur négatif de l'autophagie. En effet, FLIP pourrait interagir avec Atg3 par compétition avec LC3 et par conséquent bloquer l'élongation de l'autophagosome (Nikoletopoulou et al. 2013).

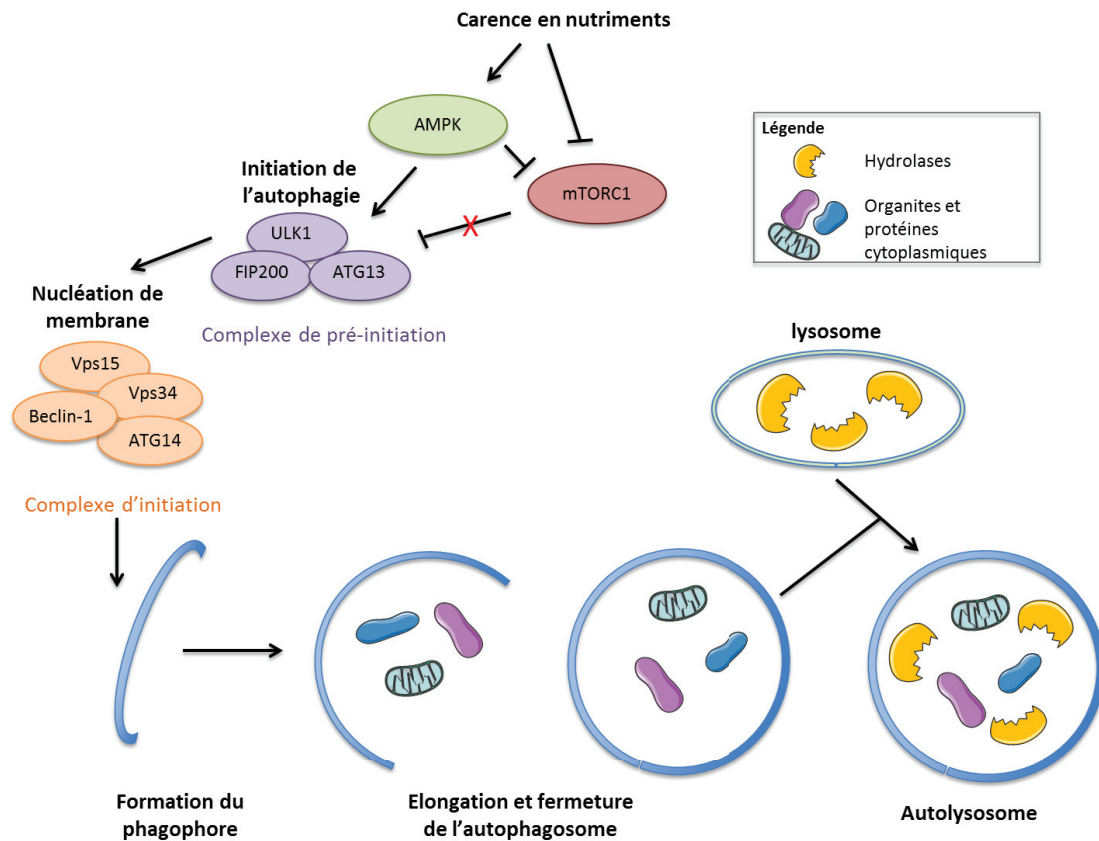


Figure 4 : Représentation schématique de l'autophagie (Figure originale). En cas de carence en nutriments, mTORC1 est inhibée alors qu'AMPK est activée, favorisant ainsi la formation du complexe de pré-initiation puis du complexe d'initiation. Le phagophore se forme de novo à partir de membrane cytoplasmique. Après élongation et fermeture, l'autophagosome contenant le matériel cytoplasmique peut fusionner avec un lysosome. Le contenu de l'autolysosome est alors dégradé.

2.3. La nécrose

2.3.1. Présentation générale

Si on peut considérer l'apoptose comme une mort « propre », à la suite de laquelle tous les déchets cellulaires sont phagocytés, la nécrose est, elle, caractérisée par un gonflement des cellules avec rupture de la membrane plasmique. Il y a par conséquent un rapide efflux des constituants cytoplasmiques dans l'espace extracellulaire, déclenchant une forte réponse inflammatoire. Contrairement à l'apoptose, la fragmentation de l'ADN observée dans le cas de la nécrose est moins organisée et régulière, formant une échelle de bandes très aléatoires après dépôt sur gel d'agarose (Proskuryakov, Konoplyannikov, et Gabai 2003). A l'origine, l'apoptose était seule qualifiée de mort programmée, par opposition à la nécrose. Cette distinction est cependant devenue obsolète, avec l'identification de signaux inducteurs déclenchant la nécrose. La nécrose n'est donc plus considérée comme un phénomène passif sans activation de voies de signalisation particulières, puisqu'elle

met en jeu de nombreuses voies moléculaires, notamment dans les cas où l'intégrité de la cellule est perturbée (haute température, stress mécanique). Différents stimuli peuvent déclencher la nécrose comme les cytokines, les pathogènes divers (virus, bactéries, protozoaires), les toxines, ou les cellules immunitaires (lymphocytes Natural Killer, macrophages).

2.3.2. Mécanistique de la nécrose et de la nécroptose

La nécrose peut intervenir de façon passive, sans activation de voies de signalisation particulières, dès lors que l'intégrité de la membrane plasmique est perturbée, notamment en cas de stress mécanique ou dû à la chaleur.

En revanche, la présence d'un ADN viral double brin ou d'ADN endommagé peuvent induire l'engagement de la cellule dans ce processus nécroptique. De même que pour l'apoptose, les récepteurs de mort TRAIL-R, Fas ou TNFR1 peuvent déclencher la nécroptose et converger vers l'activation de la Receptor-interacting serine/threonine-protéine kinase 3 (RIP3), après recrutement par les récepteurs de mort d'une plateforme multiprotéique baptisée RIPoptosome ou nécrosome en référence à l'apoptosome (Voir [Figure 7](#)). Les récepteurs immunitaires Toll-like ainsi que les récepteurs des lymphocytes T (TCR, T-Cell Receptor) peuvent également activer RIP3 (Douglas R. Green et Llambi 2015).

3. Rôles physiologiques et pathologiques de la mort cellulaire

3.1. Rôle physiologique de la mort cellulaire

3.1.1. Implication de la mort cellulaire dans le développement

La mort cellulaire est un processus indispensable à la structuration de l'organisme au cours du développement. Différentes vagues d'apoptose ont lieu pour sculpter les organes et limiter l'hyperplasie des tissus. Un exemple classique et plutôt visuel de l'importance de l'apoptose pendant le développement embryonnaire humain est la mort des cellules du mésoderme, permettant de passer d'un membre à l'extrémité « palmée » à une main munie de doigts indépendants. Un défaut d'apoptose au cours de la formation de l'embryon peut entraîner une persistance du mésoderme interdigital, et une syndactylie partielle ou totale (Montero et Hurlé 2010). La nécrose a également été impliquée dans ce phénomène de mort interdigitale (Chautan et al. 1999).

De même, nous devons, nous humains, à une vague d'apoptose le fait de ne pas naître dotés d'une excroissance caudale, puisque nous possédons bien, à l'état embryonnaire, une queue comme de nombreux Mammifères chez qui elle persiste. La mort cellulaire est donc nécessaire à l'élimination de structures embryonnaires vestigiales, empreintes de

l'évolution. La mort cellulaire est également critique au cours du développement du cerveau. Lors des deux premières semaines après la naissance, un tiers de nos neurones meurent par apoptose (Kristiansen et Ham 2014). De même, on estime que 50% des neurones sensoriels innervant la peau et des moto-neurones se connectant aux muscles vont mourir avant d'atteindre leur cible (Ryu et al. 2016). D'autres types de mort cellulaire interviendraient dans ce processus puisque bloquer l'apoptose dans un modèle murin n'empêche pas la mort des neurones souches du cerveau ni ceux de la moelle épinière (Proskuryakov, Konoplyannikov, et Gabai 2003).

La mort autophagique joue également un rôle clé dans le développement et semble être un processus phylogénétiquement ancien puisqu'également décrit chez le ver *C. elegans* et la Drosophile (Tsujiimoto et Shimizu 2005). Chez les Invertébrés, elle est déclenchée par l'hormone ecdysone au cours de la métamorphose et permet l'involution des glandes salivaires et du tube digestif (Douglas R. Green et Llambi 2015). Chez les Vertébrés, elle est impliquée dans la régression de différentes structures comme le canal de Müller (Clarke 1990).

3.1.2. Rôle de la mort cellulaire dans la mise en place du système immunitaire

Au cours du développement du système immunitaire, l'apoptose est indispensable pour supprimer les lymphocytes auto-réactifs. Les chaînes lourdes et légères du BCR, immunoglobuline de surface spécifique des LB sont codées par les gènes V (50 gènes), D (20 gènes), J (6 gènes) et C (9 gènes) localisés sur des chromosomes différents. On observe pendant la maturation du lymphocyte B des réarrangements de ces locus se faisant au hasard afin d'augmenter la diversité des immunoglobulines. Ces réarrangements génétiques du BCR (B-Cell Receptor), peuvent conduire à la création de cellules réactives envers les antigènes du Soi. L'engagement du BCR par un antigène du Soi déclenche le suicide de la cellule par apoptose afin que celle-ci soit éliminée. Chez les souris invalidées pour les protéines pro-apoptotiques Bax et Bak spécifiquement dans le lignage B, on observe un syndrome développemental caractérisé par la persistance de cellules B non matures (Opferman 2008). Comme mentionné précédemment, il est indispensable de limiter le nombre de lymphocytes T activés après une réponse immunitaire. Il a été montré que l'élimination de ces cellules excessives peut être effectuée par apoptose mais aussi par nécrose (Holler et al. 2000).

3.1.3. Rôle de la mort cellulaire dans le renouvellement tissulaire

On retrouve un autre exemple de cette co-existence apoptose/nécrose au cours du renouvellement de l'épithélium du petit intestin dans lequel les entérocytes peuvent être détruits par l'une ou l'autre des morts cellulaires (Mayhew et al. 1999). L'intestin des Mammifères est composé d'une succession de cryptes et de villi, recouverts d'une simple couche de cellules épithéliales, renouvelée tous les 4 à 5 jours afin d'éviter l'accumulation de dommages dus notamment aux stress mécaniques et chimiques inhérents à la fonction digestive. Le fort renouvellement des cellules épithéliales est assuré par les cellules

souches intestinales localisées à la base de la crypte. Ces cellules se différencient et migrent progressivement vers le haut du villus, puis sont éjectées par une pression mécanique. Ces cellules meurent donc par anoïkis, une mort cellulaire de type apoptotique puisqu'elles se retrouvent sans ancrage ([Figure 5](#)).

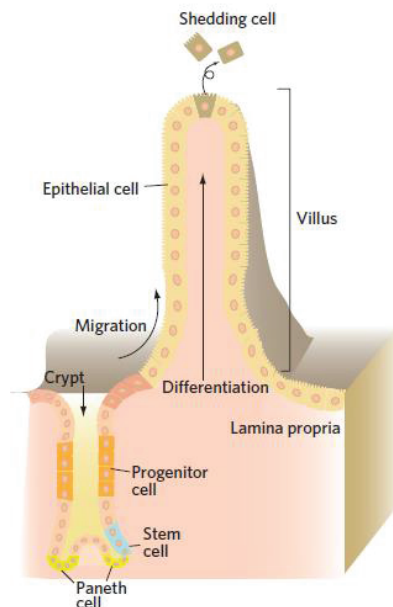


Figure 5 : Schéma du renouvellement de l'épithélium intestinal (Ashida et al. 2012). La crypte contient les cellules souches nécessaires au renouvellement ainsi que les cellules de Paneth qui sécrètent les facteurs dit « souches ». Les cellules migrent vers le haut du villus et se différencient avant d'être éjectées dans la lumière intestinale.

La nécrose est également indispensable lors d'une lésion du muscle squelettique. En effet, lorsque le muscle est lésé, une phase de nécrose intensive est enclenchée, permettant notamment d'initier une réponse inflammatoire, pouvant aboutir à la destruction du muscle entier. Elle se caractérise par une rupture du sarcolemme, membrane musculaire ainsi qu'un déversement de protéines musculaires telles que la créatine kinase. La fibre musculaire peut ensuite se régénérer et retrouver son aspect et sa fonction initiale (Chargé et Rudnicki 2004).

3.2. Dérégulation de la mort cellulaire et pathologies

La mort cellulaire est un processus finement régulé qualitativement et quantitativement. Des dysfonctionnements dans ce processus, se traduisant par un excès ou par un défaut d'induction, peuvent très rapidement devenir délétères pour un organisme.

3.2.1. Quand la mort devient excessive...

De nombreux syndromes dans lesquels la balance penche du côté d'un excès de mort cellulaire ont été décrits, dans différents contextes pathologiques. Vu l'importance de l'apoptose lors de sa mise en place, il n'est pas étonnant de trouver des descriptions de l'implication de cette mort cellulaire dans différentes pathologies affectant le système nerveux. Dans la maladie de Parkinson par exemple, les neurones dopaminergiques meurent de manière anormale par apoptose et ce phénomène peut être inversé par adjonction de facteurs neurotrophiques. Dans la maladie d'Alzheimer, il a été montré *in vitro* que le peptide β -amyloïde qui s'accumule de façon problématique dans cette pathologie entraîne également la mort des neurones par apoptose (Mazarakis, Edwards, et Mehmet 1997). Dans le cas du diabète de type I, maladie auto-immune, les cellules β du pancréas productrices d'insuline sont détruites par une mort importante de type apoptotique et nécrotique (Wilcox et al. 2016).

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin sont à la frontière de cette notion, puisque il a été montré qu'un excès d'apoptose touche les cellules épithéliales intestinales, perturbant ainsi les fonctions protectrices de la barrière mucoale alors que les cellules inflammatoires deviennent, quant à elles, résistantes à la mort cellulaire et s'accumulent dans la paroi intestinale (Eder et al. 2014).

3.2.2. Défaut de mort cellulaire et pathologies

a) Dans les maladies auto-immunes

Le syndrome lymphoprolifératif auto-immun est caractérisé par une lymphoprolifération, des réactions auto-immunes dirigées contre les plaquettes, les hématies et les neutrophiles provoquant une cytopénie ainsi qu'une forte susceptibilité à développer des lymphomes. Ce syndrome est associé à des mutations dans le gène Fas menant à une dérégulation de l'homéostasie lymphocytaire. Les patients atteints de ce syndrome présentent des lymphocytes T totalement ou partiellement (en fonction du stade) insensibles à l'apoptose induite par Fas qui vont pouvoir activer des lymphocytes B dont des lymphocytes B autoréactifs produisant des anticorps dirigés contre le Soi.

b) Dans les cancers

Un déficit, voir un blocage de la mort cellulaire est également associé à la survenue de cancers. D'après le modèle de Hanahan et Weinberg, l'échappement à la mort cellulaire fait d'ailleurs partie des dix caractéristiques que doit acquérir une cellule pour devenir tumorale, en plus de l'autosuffisance en signaux de croissance, de l'insensibilité aux signaux inhibiteurs de croissance, de la capacité à se répliquer indéfiniment et à induire de l'angiogénèse et à métastaser, auxquelles se sont ajoutées en 2011 deux nouvelles

caractéristiques, la capacité à détourner le métabolisme de la cellule et celle à échapper au système immunitaire (Hanahan et Weinberg 2011).

La mort cellulaire est, malgré l'existence d'importantes altérations notamment génétiques, une des principales barrières pouvant contrer une prolifération cellulaire anarchique. Différents mécanismes à l'origine d'un contournement de ce processus et à l'acquisition d'une capacité de résistance à la mort ont été décrits dans le contexte de la tumorigenèse, permettant aux cellules tumorales de se multiplier et de survivre.

Les voies apoptotiques sont bloquées de plusieurs manières dans les cancers (de Bruin et Medema 2008) :

- La dérégulation de la signalisation des récepteurs de mort, par diminution de l'expression des récepteurs et/ou des ligands notamment
- La perturbation de l'équilibre de la famille Bcl-2. Une surexpression de protéines anti-apoptotiques comme l'oncogène Bcl-2 est observé dans les leucémies myéloïdes aiguës, les lymphomes folliculaires mais également dans les tumeurs solides de la prostate, du sein ou encore du poumon. Bcl-2 doit son nom à la fréquente translocation de son gène dans les lymphomes folliculaires qui le place près d'un gène d'immunoglobuline induisant ainsi sa forte surexpression dans les lymphocytes B et permet le blocage de la mort par séquestration des protéines BH3 apoptotiques. On observe réciproquement une diminution de l'expression des protéines pro-apoptotiques comme Bim, Bid, Bax et Bak.
- Une diminution de l'expression des caspases ;
- Une diminution ou perte de l'expression de gènes pro-apoptotiques, comme le suppresseur de tumeur *TP53*, dont l'expression est perdue dans plus de 50% des cancers humains (Harvey et al. 1993).

L'autophagie représente également un moyen de contrôle du développement tumoral. Chez les Mammifères, Elgendy et al., ont décrit que dans une lignée humaine de neuroblastome contenant le gène Ras constitutivement actif, la mort induite par Ras est inhibée lorsque les gènes de l'autophagie Atg5, Atg7 ou Beclin1 sont inactifs. Ce mécanisme permettrait de limiter les effets oncogéniques de Ras, fréquemment dérégulé dans les cancers (Elgendy et al. 2011).

Il est intéressant de noter qu'un mécanisme de compensation existe entre les différentes morts : il a par exemple été observé dans un modèle murin de lymphomes qu'inhiber l'autophagie favorise l'induction de l'apoptose et améliore la régression des tumeurs (Amaravadi et al. 2007). Et réciproquement, plusieurs études ont montré que dans les tumeurs résistantes à la mort apoptotique, il est possible grâce à des traitements de type radiothérapie d'induire une mort de type autophagique notamment par la voie TLR9-ERK-mTOR (X. Li et al. 2016).

II. Des récepteurs membranaires aux récepteurs à dépendance : les acteurs de la mort cellulaire

1. Les récepteurs membranaires et l'intégration des signaux extracellulaires

1.1. Approche historique de la notion de récepteurs

Le concept de récepteur cellulaire a initialement été proposé par Paul Ehrlich en 1900, un des pères de l'immunologie, Prix Nobel en 1908 (Figure 6).

Sa passion pour la mise au point de nouvelles techniques de coloration l'a conduit à noter l'affinité spécifique de certains colorants pour un tissu donné, comme celle du bleu de méthylène pour les tissus nerveux par exemple. Il mit également au point dans le laboratoire de Robert Koch une coloration à la fuchsine pour le bacille de la tuberculose. Ces premiers constats lui laissèrent penser qu'une « substance » sur les cellules permettait au colorant de les marquer spécifiquement. Suite notamment à ses travaux sur les toxines de plantes, comme l'abrine et la ricine, à partir desquels il observa, qu'en administrant à des souris des doses croissantes de ces composés, il était possible d'immuniser les souris, il émit la théorie des chaînes latérales (Chatenoud et Bach 2012). Selon cette théorie, il existerait dans le corps des chaînes latérales, ou récepteurs, localisés sur les cellules et s'étendant à l'extérieur, pouvant fixer un antigène spécifique et ainsi déclencher une réponse immunitaire (Kasten 1996). L'effet neutralisant des anticorps serait le résultat de la liaison de l'antigène sur l'/les anticorps membranaire(s) résultant en une activation de la cellule immunitaire.

En 1905, John Newport Langley émit à son tour l'hypothèse de « substances réceptives » sur les cellules, dans le cadre de ses recherches sur le fonctionnement du tissu musculaire (MAEHLE 2004). Il observa les effets de la nicotine sur la fibre musculaire : la drogue est capable d'induire une contraction musculaire, alors même que la cellule a été dénervée. Il comprit ainsi que la nicotine pouvait agir directement sur les cellules musculaires et développa la notion d'antagoniste, en observant que l'addition de curare contrecarrait cet effet (Langley 1905). Ces résultats soutenaient donc la théorie d'Ehrlich sur la présence d'une « substance » membranaire pouvant servir de récepteur non seulement aux antigènes mais également à certaines drogues.

Après être tombée dans l'oubli pendant plusieurs décennies, l'existence des récepteurs décrits par Ehrlich et Langley fut finalement confirmée 60 ans plus tard, grâce aux progrès techniques et à l'avènement de la microscopie électronique. Celle-ci permit de visualiser ces structures membranaires, et leur isolement fut finalement réalisé à l'aide de détergents non ioniques comme le Triton X100. Les premiers récepteurs membranaires identifiés furent notamment le récepteur cholinergique chez la torpille ou le récepteur à l'insuline chez le rat (Cuatrecasas 1972) (Molinoff et Potter 1972).

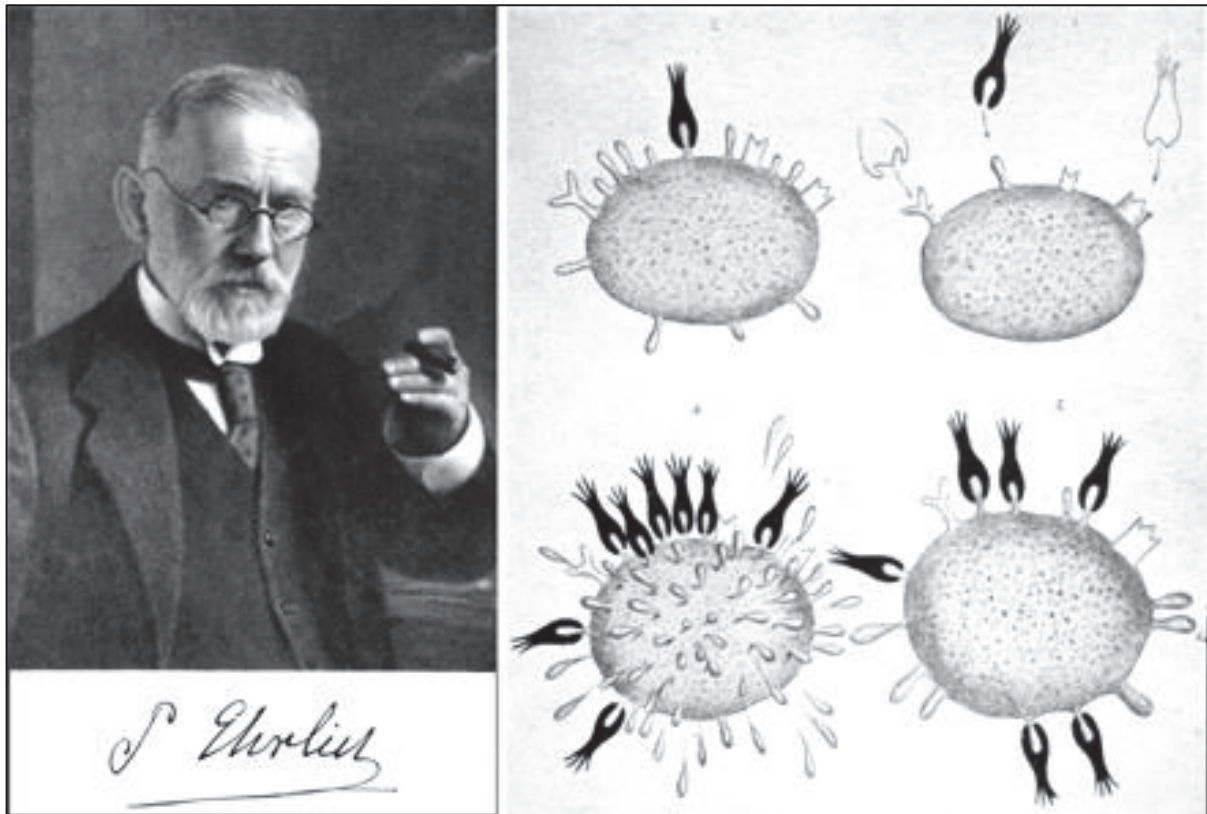


Figure 6 : Schéma de récepteurs cellulaires, présenté par Paul Ehrlich en 1900 à la Royal Society de Londres (Ehrlich, 1900). D'après sa théorie des chaînes latérales, les cellules immunitaires sont dotées d'un large répertoire de récepteurs membranaires, chacun spécifique d'une substance particulière. L'interaction entre un récepteur et sa toxine induirait une activation de la cellule, qui produirait alors plus de récepteurs, pouvant être libérés dans la circulation sanguine afin de neutraliser la toxine.

1.2. Généralités sur les récepteurs membranaires

Actuellement, un récepteur membranaire est défini comme étant une protéine ancrée dans la membrane plasmique, capable de capter des signaux divers comme un antigène provenant d'un pathogène, des cytokines, des neurotrophines, des facteurs de croissance ou encore des neuromédiateurs jouant le rôle de ligands, et d'induire en retour une signalisation menant à une réponse physiologique telle que la sécrétion d'anticorps ou la contraction musculaire pour reprendre les deux exemples développés précédemment. Un récepteur membranaire est structuré en 3 parties : une partie extracellulaire permettant la fixation spécifique du/des ligand/s, une partie transmembranaire pour l'ancrage dans la cellule ainsi qu'une partie intracellulaire nécessaire à la transmission du signal induit par la fixation du ligand. L'interaction spécifique entre un ligand, qualifié de premier messager et de son récepteur entraîne une réaction moléculaire en cascade à partir de la face intracellulaire de la membrane plasmique. Le récepteur traduit le signal reçu via un second messager cytoplasmique afin d'induire une réponse de la cellule : c'est la phase de transduction.

Les modalités de transduction d'un stimulus, les voies de signalisation et les réponses biologiques déclenchées par la fixation d'un ligand sur son récepteur sont aussi précis que divers.

On peut diviser les récepteurs membranaires en trois catégories principales :

- Les récepteurs à activité enzymatique, tyrosine kinase (RTK) comme les récepteurs au NGF, VEGF ou IGF ou phosphotyrosine phosphatase (RTP) ou encore serine/thréonine kinase comme le TGF β (Transforming Growth Factor β). Après fixation de leur ligand, ces récepteurs se dimérisent et induisent une cascade de phosphorylation, ou de déphosphorylation.
- Les récepteurs sans activité enzymatique, comme les récepteurs membranaires couplés aux protéines G et dont la structure comporte 7 hélices alpha transmembranaires. Une fois lié à leur ligand, les récepteurs peuvent s'associer à une protéine G, second messenger formé de 3 sous-unités α , β , et γ . La protéine G passe alors d'un état trimérique lié au GDP à un état dissocié par la liaison du GTP. La sous-unité $G\alpha$ libérée peut alors interagir avec d'autres effecteurs comme l'adénylate cyclase ou la phospholipase C (Neves, Ram, et Iyengar 2002).
- Les récepteurs ionotropes composés d'une partie extra-cellulaire sur laquelle va se lier le ligand (neurotransmetteur), permettant ainsi l'ouverture du canal transmembranaire, par lequel vont circuler des ions jouant alors le rôle de messagers secondaires. Le récepteur nicotinique à l'acétylcholine, perméable aux ions K^+ en présence de ce ligand, fait partie de cette catégorie.

Afin de mieux se rendre compte de la diversité biologique des récepteurs membranaires, les chiffres suivants peuvent être pris en compte : on distingue dans le génome humain 58 gènes codant pour des récepteurs à tyrosine kinase, 800 gènes prédits pour coder un récepteur couplé aux protéines G et 313 gènes codant chacun pour un récepteur ionotropique (Gabashvili et al. 2007; Vassilatis et al. 2003). Les voies de signalisation induites par les récepteurs membranaires après fixation de leur ligand sont très variables allant de l'apoptose à la prolifération, la modulation du cytosquelette ou la sécrétion d'hormones. La multiplicité des réponses engendrées provient aussi du fait que plusieurs ligands peuvent interagir avec le même récepteur mais déclencher des réponses différentes. Pour un même récepteur, les complexes intracellulaires après liaison du ligand peuvent également différer en fonction des sous-types cellulaires. La complexité de signalisations pouvant être engendrées par la fixation d'un ligand sur son/ses récepteurs peut être illustrée par l'exemple de la famille des récepteurs à tyrosine kinase ErbB comprenant 4 membres ErbB1 (EGFR), ErbB2, ErbB3 et ErbB4. Si aucun ligand n'est connu à l'heure actuelle pour ErbB2, EGFR peut lier EGF et le TGF- α alors que les récepteurs ErbB3 et ErbB4 peuvent lier les ligands de la famille des neurégulines. ErbB2 peut toutefois s'hétérodimériser avec ErbB3 en tant que co-récepteur. La liaison d'un ligand sur son récepteur peut activer différentes voies comme STAT, PLC, PI-3K, MAPK, JNK ou encore PKB, favorisant finalement l'activité de facteurs de transcription régulant divers mécanismes cellulaires. De plus, il a été montré que les récepteurs à tyrosine kinase peuvent eux-aussi favoriser l'échange GDP/GTP des petites protéines G (Schlessinger et Lemmon 2003). Les voies de signalisation activées sont variées et non linéaires et vont

dépendre de l'homo ou hétérodimérisation du récepteur, ainsi que des sites phosphorylés, puisque les protéines adaptatrices recrutées vont être différentes. Les mécanismes menant à ces différentes voies ne sont pas encore tous décrits, mais il a été montré par exemple que le recrutement de la protéine Grb2 permet l'activation de la voie des MAPK (Yarden et Sliwkowski 2001). De même, la signalisation induite par les Ephrins et leurs récepteurs Eph illustre également bien cette complexité. Ayant un rôle majeur au cours de la neurogenèse, les récepteurs Eph appartiennent à la classe des récepteurs à tyrosine kinase. On distinguera les récepteurs de classe A, EphA (1 à 10) pouvant lier les molécules Ephrin-A (1 à 6) et les récepteurs de classe B (1 à 6) ayant pour ligand les Ephrin-B (1 à 3). On retrouve certains croisements entre les classes comme EphB2 pouvant lier l'Ephrin-A5 ou EphA4 pouvant interagir avec l'Ephrin-B3. Il faut noter les récepteurs Eph, mais également leurs ligands Ephrin sont des protéines membranaires. L'activation du récepteur par son ligand nécessite donc un contact cellule-cellule. La signalisation des couples Eph/Ephrin fonctionne sur un mode « forward/reverse » car la liaison du ligand à son récepteur induit une activation de voies moléculaires dites « forward » dans la cellule possédant le récepteur mais également une signalisation dite « reverse » dans celle contenant le ligand (Aoto et Chen 2007). Il a été montré que la signalisation Eph/Ephrin peut influencer différents processus comme la migration et l'adhésion cellulaire mais également le guidage axonal avec des effets pouvant être attractif ou répulsif (Cramer et Miko 2016).

Cette complexité permet une multiplicité de réponses cellulaires à différents stimuli, permettant une adaptation de l'état de la cellule à son environnement.

2. Les récepteurs membranaires et la régulation de la mort cellulaire

2.1. Les récepteurs de mort : acteurs clés de la voie extrinsèque

Comme évoqué plus tôt, la mort cellulaire, de type apoptotique lorsqu'il s'agit de la voie extrinsèque, ainsi que la nécrose peuvent être déclenchées par des récepteurs membranaires appelés « récepteurs de mort ». Ils appartiennent à la super-famille des TNF et peuvent induire la mort par activation finale de la caspase 8. Cette famille comprend 8 membres : Fas, TNFR1, TRAIL-R1 (TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand Receptor 1), TRAIL-R2, DR3, DR6, NGFR et EDAR. Ces récepteurs possèdent quelques homologies structurelles entre eux, et notamment la présence dans leur partie intracellulaire d'un Death Domain ainsi que celle d'un domaine riche en cystéine dans leur région extracellulaire. Le déclenchement de la signalisation par cette famille de récepteur est dû à la fixation de leur ligand respectif sous forme de trimère, induisant par la même une homo-trimérisation et une activation du récepteur.

Les récepteurs Fas et TRAIL-R ont le même mode de fonctionnement : ils recrutent tout d'abord *via* leur DD intracellulaire la protéine FADD (Fas-Associated Death Domain), qui

en contient également un, grâce à une interaction DD-DD. Un complexe protéique appelé DISC (Death-inducing Signaling Complex) est alors recruté et active la caspase 8. La caspase 8 peut alors soit cliver la caspase 3 soit activer la voie mitochondriale.

Le couple Fas/FasL est impliqué dans différents processus, et notamment dans le maintien de sites immunitaires spécifiques, appelés sites immuns privilégiés, sans lymphocyte infiltrant ni cellule inflammatoire, le but étant vraisemblablement d'éviter l'apparition d'une réponse inflammatoire dans des organes pour lesquels elle pourrait avoir des conséquences désastreuses (cerveau, yeux, placenta, testicules). Les lymphocytes expriment le récepteur Fas alors que les cellules de ces organes comme la cornée ou les testicules expriment FasL permettant ainsi l'élimination des cellules inappropriées (D. R. Green et Ware 1997). L'apoptose induite par le couple TRAIL/TRAIL-R1 permet quant à elle d'éliminer les cellules tumorales ou infectées par un virus qui n'expriment plus les molécules du Soi. Le ligand TRAIL exprimé par les lymphocytes NK (Natural Killer) va ainsi pouvoir déclencher la mort de ces cellules anormales (Huang et al. 2016).

Cependant, la signalisation induite par les récepteurs de mort peut être plus complexe (Figure 7). Ainsi, le fonctionnement du récepteur TNFR1 est moins linéaire, puisqu'il peut induire de la survie, de l'apoptose ou la nécroptose. La voie de signalisation déclenchée va dépendre du complexe recruté. La fixation du ligand peut induire la formation d'un complexe dit « I » contenant les protéines TRADD, ainsi que les ubiquitine ligases TRAF2 et cIAP1/2 qui permettent à la protéine RIPK1 de rester sous sa forme ubiquitinyllée, ce qui stabilise le complexe I. La voie de signalisation de NFκB est alors enclenchée aboutissant à la survie de la cellule. L'activation de NFκB induit l'expression de la protéine FLIP, qui inhibe en retour la caspase 8 assurant ainsi la coordination des voies de survie et de mort cellulaire. Lorsque RIPK1 est desubiquitinyllée, le complexe I est déstabilisé. TRADD et RIP1 sont alors libérées dans le cytosol et peuvent ainsi recruter des protéines différentes pour former le complexe II. Le complexe II peut induire soit l'apoptose lorsque TRADD et RIPK1 s'associent à FADD pour activer la caspase 8, soit la survie lorsque FLIP est présent et inhibe l'activation de la caspase (Micheau et Tschopp 2003). Enfin, en absence de FADD et de la caspase 8, RIPK1 peut s'associer à RIP3 et MLKL pour induire la nécroptose.

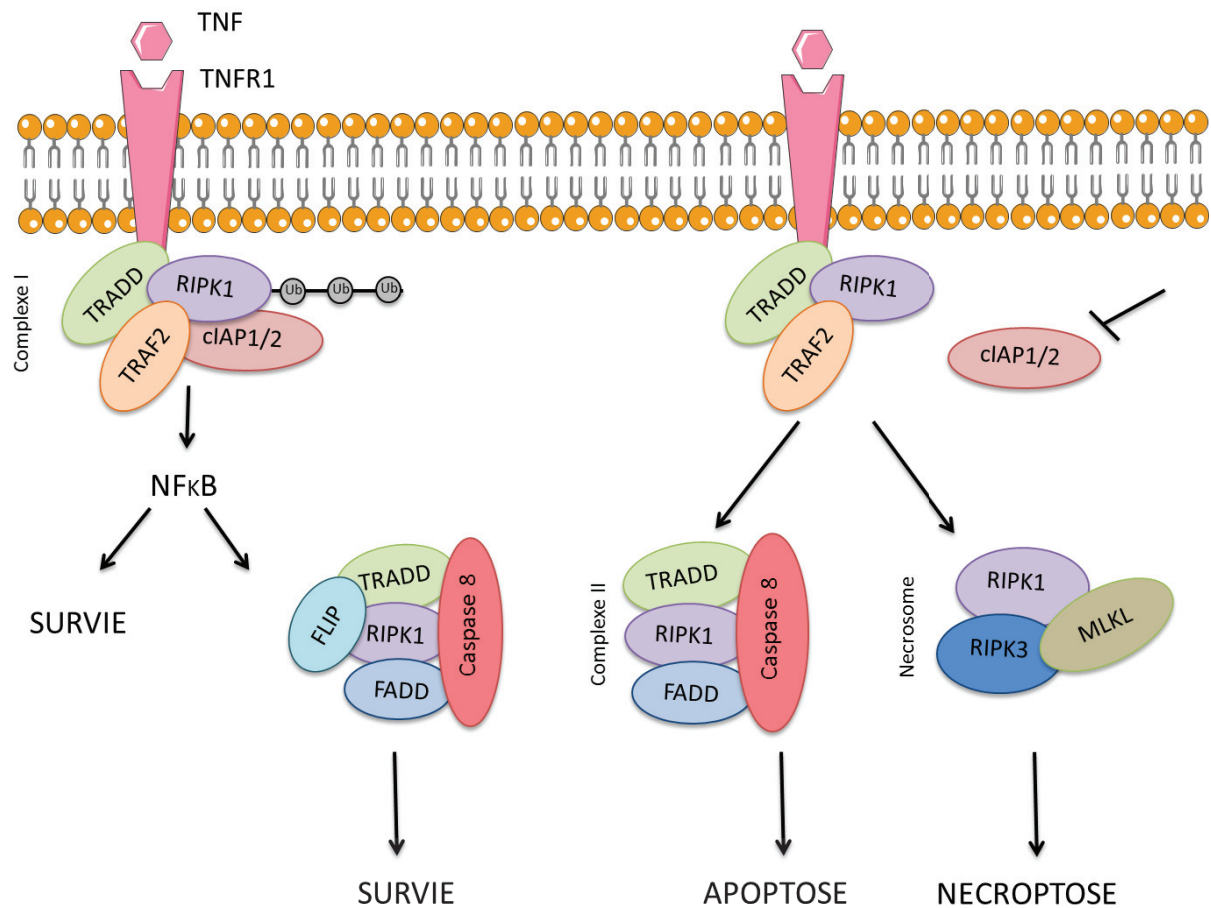


Figure 7 : Les différentes voies de signalisation déclenchées après fixation du ligand TNF sur son récepteur TNFR1 (Figure originale). Lorsque la protéine RIPK1 est ubiquitinylée, le complexe I est stabilisé et induit une signalisation favorisant la survie cellulaire. Au contraire, lorsque RIPK1 est désubiquitinylée, elle se retrouve avec TRADD, libre de s'associer avec d'autres partenaires cytoplasmiques formant alors soit le complexe II qui déclenche l'apoptose soit le nécrosome qui va induire la nécroptose.

2.2. Les récepteurs à neurotrophines et la Théorie Neurotrophique

Si les récepteurs de mort enclenchent la mort cellulaire seulement en présence de leur ligand, d'autres à l'inverse, ont un programme de mort toujours enclenché par défaut, à moins qu'elles ne reçoivent un signal extérieur pour le contrecarrer.

C'est la théorie neurotrophique. La découverte de la neurotrophine NGF puis, plus tard, d'autres protéines appartenant à la même famille telles que BDNF, NT-3 ou NT-4 a permis le développement de cette notion, selon laquelle un neurone en migration va mourir, à moins qu'il ne rencontre un signal qui pourra le faire survivre (Oppenheim 1989). La survie des neurones est en d'autres termes, dépendante de la fixation de la neurotrophine sur un récepteur membranaire neuronal de type phosphotyrosine kinase : respectivement TrkA pour NGF, TrkB pour BDNF, NT-4 et NT-3 et TrkC pour NT-3. Le

récepteur p75^{NTR} quant à lui, est moins spécifique et capable de lier toutes les neurotrophines.

Les neurotrophines étant sécrétées par les cellules cibles des neurones en quantité limitante, plus de la moitié des neurones formés au cours du développement vont mourir, faute de liaison entre leurs récepteurs membranaires et un facteur de survie. Ce « contrôle social » défini par Raff en 1992 permettrait donc d'assurer l'intégrité des tissus en assurant un nombre approprié de neurones en fonction du nombre de cellules cibles à connecter. Les neurotrophines permettent d'inactiver la signalisation de mort enclenchée par défaut, en activant des voies de signalisation de survie comme Akt ou MAPK qui vont à leur tour inactiver les protéines pro-apoptotiques comme Bad (Datta et al. 2002; Raff 1992). Au-delà d'un rôle dans le système nerveux, les facteurs trophiques aussi divers soient-ils, sont indispensables à tous types de cellules afin d'assurer un signal de survie continue et ainsi d'éviter la mort cellulaire programmée par défaut.

Le fonctionnement des récepteurs à neurotrophines est donc opposé à celui des récepteurs de mort. Une troisième classe de récepteurs impliqués dans la régulation de l'équilibre survie/mort a été décrite plus récemment, celle des récepteurs à dépendance (RD)

3. Les Récepteurs à Dépendance : un nouveau paradigme dans la régulation de la mort cellulaire

3.1. Caractéristiques fonctionnelles des RD

Depuis une vingtaine d'années, une nouvelle classe de récepteurs capables de réguler la survie et d'induire l'apoptose a été décrite et constitue la famille des récepteurs à dépendance (RD) (P. Mehlen et al. 1998). La particularité de cette famille fonctionnelle (puisque la structure de chaque récepteur est radicalement différente) réside dans sa capacité à induire deux signalisations :

- en présence de ligand, une voie de signalisation positive de survie, prolifération ou différenciation ;
- en absence de ligand, le récepteur ne reste pas inactif, mais induit au contraire activement la mort cellulaire par apoptose.

L'activité apoptotique des RD peut leur permettre de restreindre les cellules à un environnement riche en ligand, contrôler les proliférations excessives et éliminer les cellules migrant de façon aberrante dans un environnement sans ligand, puisque dépendantes de la disponibilité en ligand dans le milieu extracellulaire pour survivre. Les RD se distinguent des récepteurs aux neurotrophines, puisque la cellule ne meurt pas par absence de signal positif mais au contraire par un processus actif menant à l'activation de l'apoptose. En ce sens, l'inactivation de l'expression de RD est favorable à la survie cellulaire, contrairement à l'effet associé à l'extinction des récepteurs aux neurotrophines.

Les RD diffèrent également des récepteurs de mort, qui induisent une signalisation apoptotique en réponse à la fixation de leur ligand. *In vitro*, inhiber l'expression du ligand par siARN induit une augmentation de la mort cellulaire déclenchée par le RD non lié alors qu'au contraire, sans son ligand, un récepteur de mort de la famille du TNF n'induit plus ce processus. En somme et à l'inverse des récepteurs « classiques » décrits précédemment, qui se comportent selon un mode on/off selon l'état de fixation à leur ligand, les RD induisent en permanence un signal et fonctionnent donc sur un mode on/on. Les RD ont donc une dualité de fonction qui explique en partie le fait qu'ils jouent un rôle au cours du développement mais soient également impliqués dans de nombreux types de cancers.

La famille des récepteurs à dépendance compte actuellement une vingtaine de membres (Figure 8) : le récepteur au Nervous Growth Factor (NGF) p75NTR, RET (rearranged during transfection), les récepteurs aux neurotrophines TrkA et TrkC, Kremen-1, EPHA4, MET, ALK, les récepteurs à la nétrine-1 DCC (deleted in colorectal carcinoma) et UNC5H1-4 (Unc-5 homologue 1-4), néogenine, Plexine D1, le récepteur à l'insuline et son récepteur associé IGFR-I, certaines intégrines, et les récepteurs à Sonic Hedgehog (Shh), Patched1 (Ptc) et CDON (Gibert et Mehlen 2015).

Les mécanismes ainsi que les rôles physiologiques et pathologiques de ces RD sont exposés ci-après.

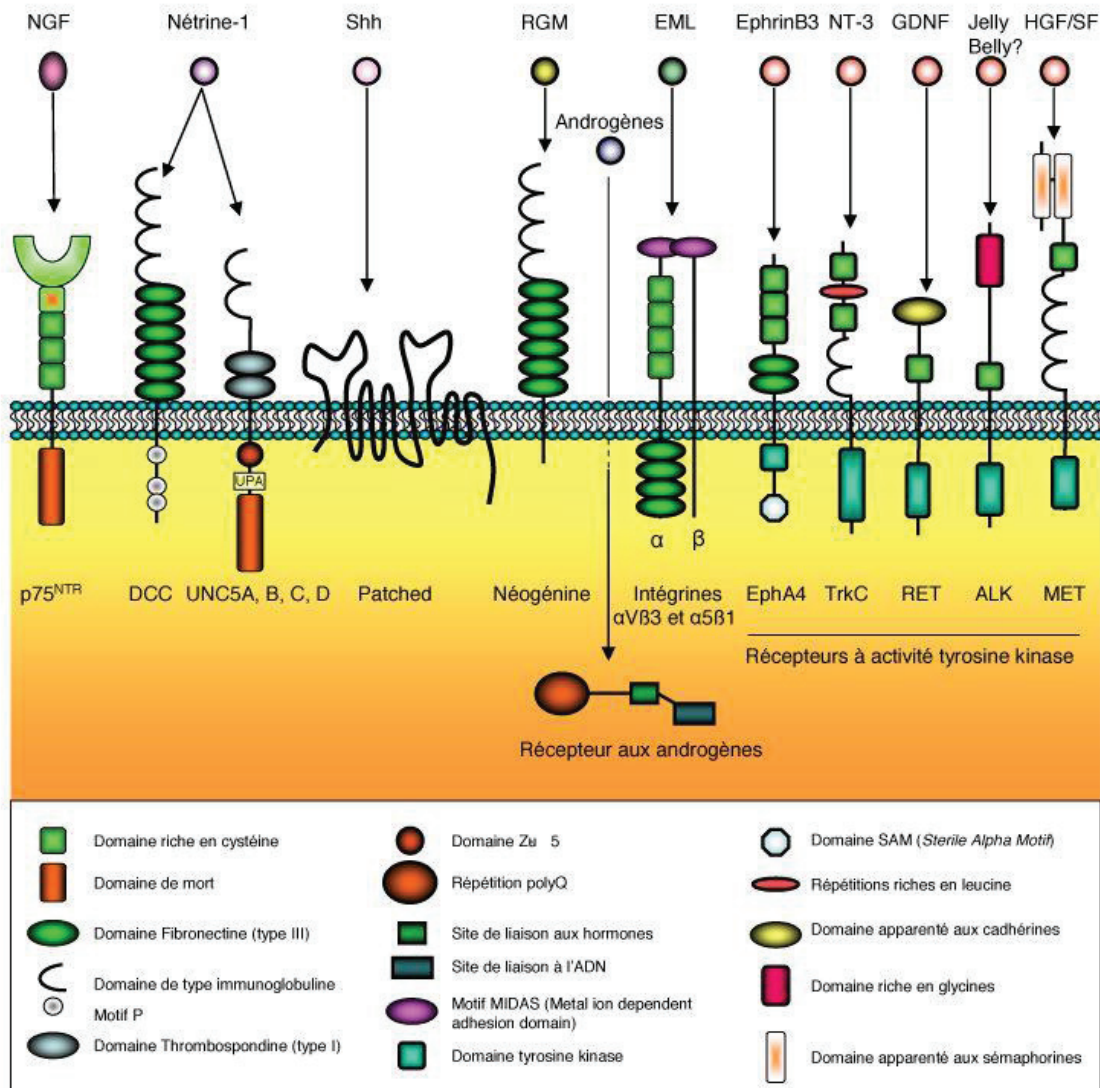


Figure 8 : La famille des récepteurs à dépendance (D'après Delcros et al, 2013). Contenant une vingtaine de membres, c'est une famille uniquement fonctionnelle puisque la structure de chaque RD est différente. Ils possèdent cependant tous la capacité d'induire l'apoptose en absence de leur ligand.

3.2. Modalités de la signalisation apoptotique induite par les RD

Les mécanismes moléculaires déclenchés par un RD libéré de son ligand restent encore incomplètement caractérisés. Les RD partageraient certaines caractéristiques comme la nécessité de leur localisation dans les radeaux lipidiques, qui faciliterait le recrutement de protéines accessoires pour induire l'apoptose. S'ils se multimérisent pour pouvoir transmettre leur signal positif de survie, certains RD ont besoin d'être dans un état monomérique pour induire l'apoptose (p75^{NTR}, DCC, UNC5B). UNC5B possède un Death Domain analogue à celui des récepteurs de mort : en présence de ligand, ce domaine est

inaccessible car le récepteur est sous forme dimérique et son DD interagit avec le domaine ZU5, ce qui le rend indisponible pour l'induction de l'apoptose.

Enfin, la transduction de la signalisation apoptotique requiert le clivage de certaines RD par des caspases, avec diverses conséquences, comme le démasquage du domaine ADD (addiction dependence domain) ou la genèse d'un fragment cytosolique pro-apoptotique (UNC5H, RET, TrkC et MET).

En l'absence de NT-3, le domaine intracellulaire de TrkC est par exemple clivé, ce qui libère un peptide baptisé Killer Fragment. Ce dernier va alors interagir avec la protéine Cobra-1 puis conjointement migrer vers la mitochondrie et induire la voie intrinsèque par activation de Bax et relargage du cytochrome c (Ichim et al. 2013). Cette caractéristique semble avoir été acquise au cours de l'évolution puisqu'on ne retrouve pas de trace de clivage chez les organismes invertébrés, tels que la drosophile ou le ver *C. elegans* (Delcros et Mehlen 2013).

Les complexes pro-apoptotiques relayant la signalisation intracellulaire commencent à être décryptés. L'absence de liaison entre le ligand Shh et son RD Ptch induit l'exposition d'un domaine permettant le recrutement d'un complexe contenant les protéines DRAL, FHL2, TUCAN et la caspase 9 ce qui va permettre l'activation de la caspase. On sait également que PP2A doit déphosphoryler la DAP kinase pour que UNC5B puisse induire l'apoptose (Guenebeaud et al. 2010).

La plupart des RD induisent une apoptose ressemblant plutôt à la voie intrinsèque puisqu'on retrouve une activation de la caspase 9 plutôt que de la caspase 8, ainsi que dans certains cas comme celui de TrkC un relargage du cytochrome c.

3.3. Rôle des RD dans le développement embryonnaire

Les membres de la famille des RD ont tous été étudiés en premier lieu pour le rôle de leur voie positive pendant le développement embryonnaire, du système nerveux en particulier. Le rôle de la signalisation apoptotique dans ce processus commence cependant à être connu. Nous étudierons ici trois exemples de couples RD/ligands dans le développement : les récepteurs à Shh, TrkC et son ligand NT3 ainsi que le couple EphrinB3 EphA4. Le rôle de la nétrine-1 et de son RD DCC dans le développement sera abordé de manière plus spécifique dans la section suivante.

Sonic Hedgehog (shh) est un morphogène sécrété par la notochorde et la plaque du plancher contribuant à l'établissement de la polarité dorso-ventrale de l'embryon. Une fois sécrétée, cette glycoprotéine va se fixer sur son récepteur Patched1 et déclencher la libération de son co-récepteur Smoothed (SMO) favorisant ainsi la translocation nucléaire des facteurs de transcription GLI (Glioma-associated), GLI1, 2 et 3, effecteurs finaux de la voie Shh. Ils peuvent ainsi activer la transcription de gènes impliqués dans différentes voies de signalisation : prolifération (Cycline-D1), apoptose (Bcl-2), angiogenèse (ANG1/2), transition épithélio-mésenchymateuse (SNAIL), cellule souche (NANOG) (Rimkus et al. 2016).

Les mutations dans la voie Shh induisent des défauts majeurs lors du développement embryonnaire. En effet, il a été montré dans un modèle murin que les mutants Patched meurent à un stade embryonnaire très précoce (9 jours de gestation) et présentent des défauts de fermeture du tube neural, une hyperplasie du rhombencéphale et de la moelle épinière, ainsi que des défauts cardiaques (Goodrich et al. 1997). On retrouve par exemple chez les patients atteints de Spina bifida des mutations dans le gène codant pour Ptc, récepteur à Shh. De manière intéressante, certaines anomalies ne consistent pas en un déficit mais en un excès de cellules, compatible avec l'hypothèse d'un rôle de la signalisation apoptotique de Ptc au cours du développement.

TrkC étant un récepteur à activité enzymatique de type tyrosine kinase, il a une capacité d'autophosphorylation. Les résidus ainsi phosphorylés permettent l'ancrage de protéines adaptatrices et l'activation de la voie Ras, puis, par un mécanisme en cascade, des voies PI3K et ERK, assurant ainsi la survie des neurones (Reichardt 2006). Le couple récepteur/ligand TrkC/NT3 a longtemps était considéré comme fonctionnant uniquement selon la théorie trophique : un neurone exprimant TrkC meurt passivement si son ligand NT3, facteur de survie est absent. En ce sens, les souris invalidées pour NT3 ou TrkC présentent une perte de neurones due à une mortalité excessive de ces cellules au cours du développement. Cependant, les souris invalidées pour NT3 présentent une perte de neurones de 70% soit une perte bien plus importante que celles invalidées pour TrkC (30%) (Tessarollo et al. 1994; Tessarollo et al. 1997). Or, selon la théorie neurotrophique, les deux modèles de souris devraient présenter le même phénotype, l'écart 30-70% s'expliquant difficilement dans ce cadre-là. La démonstration de l'appartenance de TrkC à la famille des RD a apporté un éclairage nouveau sur ces résultats. En effet, la perte de NT3 bloque à la fois la voie positive de survie et libère la fonction apoptotique de TrkC ; au contraire, la perte de TrkC se traduit par un blocage de la voie positive mais également par celui de la voie de mort cellulaire. En ce sens, le couple TrkC/NT3 est notamment impliqué au cours du développement dans le guidage des neurones des ganglions dorso-rachidiens (DRG). Il a été montré par Tauszig-Delamasure et al, qu'un retrait de NT3 d'une culture de neurones de DRG embryonnaires de souris entraîne la mort par activation de l'apoptose induite par TrkC et non uniquement par élimination d'un facteur de survie (Tauszig-Delamasure et al. 2007).

La zone sub-ventriculaire (SVZ) est une des zones principales de la neurogenèse localisée entre les ventricules latéraux et le parenchyme striatal. Elle contient notamment les cellules souches progénitrices neurales qui se différencient en neuroblastes et migrent jusqu'au bulbe olfactif, où ils terminent leur différenciation en interneurones. Il a été montré que le ligand EphrinB3 exprimée dans le striatum en bordure de la SVZ permet de réguler positivement la survie et la prolifération des cellules progénitrices neurales (Ricard et al. 2006).

Or, si les souris invalidées pour EphB3 ont un excès d'apoptose dans la SVZ, les mutants EphA4 -/- présentent au contraire un nombre excessif de neuroblastes. Cette différence de phénotype observée lors de l'invalidation du ligand ou du récepteur dans des modèles murins pourrait s'expliquer par le blocage de la mort cellulaire induite par EphA4 par son ligand EphrinB3 puisqu'il a été montré qu'EphA4 appartient à la famille des RD et que la

liaison de son ligand EphrinB3 inhibe spécifiquement la mort cellulaire par EphA4, contrairement aux autres Ephrin testées (Furne et al. 2009).

La double fonction des RD, capables de réguler le guidage axonal, la prolifération, la différenciation ou la survie des cellules *via* leur voie positive mais également négative en absence de leur ligand leur permet de jouer un rôle crucial mais complexe lors du développement embryonnaire. L'analyse de la part exacte de la voie apoptotique des RD dans le développement est un des axes de recherche de l'équipe, à l'aide de modèles murins invalidés pour les RD et/ou leur ligand, ou présentant une invalidation spécifique de la voie apoptotique.

3.4. Le côté sombre des RD : dérégulation de la signalisation apoptotique dans les cancers

Il a été supposé que les RD puissent être des acteurs de la cancérogenèse du fait de leur capacité à induire l'apoptose. En effet, l'activité anti-apoptotique des RD permettrait d'envisager qu'ils puissent jouer le rôle de suppresseur de tumeurs, empêchant la persistance de cellules surnuméraires lorsque la quantité de ligand disponible dans le milieu est limitante. On peut également supposer qu'ils permettent de limiter l'évasion des cellules vers d'autres tissus, puisqu'une cellule qui migrerait dans un territoire sans ligand serait éliminée par l'apoptose induite par le RD non lié. Les RD seraient donc de suppresseurs de tumeurs conditionnels, ne jouant ce rôle qu'en absence de ligand. En revanche, en présence de leur ligand, le signal positif induit par les RD peut constituer un avantage sélectif pour la cellule tumorale. Comme décrit précédemment, le modèle de Hanahan et Weinberg a mis en avant le fait que la mort cellulaire est un des phénomènes bloqués dans les cellules tumorales, et permettant leur survie malgré l'existence de stress ou d'anomalies intrinsèques. Logiquement et en accord avec l'hypothèse de leur rôle de suppresseur de tumeur, un blocage de la signalisation apoptotique induite par les RD a été décrit dans les cancers avec 3 modalités :

- Une perte d'expression du récepteur ;
- Un blocage des effecteurs de la voie de signalisation ;
- Un gain de ligand qui bloque la voie de mort et joue le rôle d'oncogène

Ainsi, le RD CDON induit l'apoptose en absence de son ligand Shh, après clivage de la partie intracellulaire et recrutement puis activation de la caspase 9 (Delloye-Bourgeois et al. 2013). De manière intéressante, il a été observé que l'expression de CDON est fortement diminuée dans différents types de cancers (colorectal, poumon, rein, sein, ovaire, utérus et thyroïde). Une étude a montré dans les cas de neuroblastomes, que l'expression de CDON est inversement corrélée au pronostic vital, avec une forte expression de CDON associée à un pronostic favorable. Cette dérégulation de l'expression de CDON dans les cancers pourrait résulter notamment de l'activation du miR181 (Gibert et al. 2014). La modélisation, dans un contexte murin APC^{+ / 1638N} prédisposé au développement de tumeurs intestinales, de la perte d'expression de CDON a permis de

confirmer son rôle de suppresseur de tumeur. En effet, les souris $CDON^{-/-}$, $APC^{+/1638N}$ développent 3,4 fois plus d'adénocarcinomes agressifs que leurs congénères contrôles (Delloye-Bourgeois et al. 2013). La perte du gène suppresseur de tumeur CDON semble donc être un avantage pour le développement de tumeurs intestinales. Le RD Patched1 est fréquemment muté chez des patients atteints du syndrome de Gorlin, prédisposés au développement de carcinomes des cellules basales et à la survenue de médulloblastomes sporadiques. La démonstration formelle de l'impact de ces mutations sur la capacité de Ptc à induire l'apoptose n'a pas été montrée.

Réciproquement, le ligand Shh est surexprimé dans un nombre considérable de cancers tels que : poumon, prostate, pancréas, tractus gastro-intestinal, colorectal, sein et mélanome. Dans chacune de ces tumeurs, le ligand est sécrété par la cellule tumorale elle-même ce qui favorise la prolifération et/ou la survie menant ainsi à la croissance tumorale (Scales et de Sauvage 2009).

De même, détourner la voie de signalisation TrkC/NT-3 semble être un moyen sélectionné par certaines cellules tumorales pour favoriser la tumorigenèse. Comme pour la voie Shh, on retrouve deux mécanismes de dérégulation de la voie TrkC/NT-3 dans les cancers : soit une perte du récepteur TrkC, soit une surexpression du ligand NT-3. L'équipe de Patrick Mehlen a par exemple démontré que TrkC est un gène suppresseur de tumeur dans le côlon, puisque son expression est diminuée par hyperméthylation du promoteur dans les adénocarcinomes (Genevois et al. 2013). Par ailleurs, le blocage de la signalisation apoptotique combinée à l'activation de la voie positive favorise la survie des cellules en activant la voie ERK et Akt (Lawn et al. 2015). On retrouve de plus augmentation de la production de NT-3 au niveau des métastases cérébrales issues de cancers primaires du sein, ce qui favoriserait la transition épithélio-mésenchymateuse. Dans ce contexte métastatique, NT-3 favorise l'extinction de la réaction immunitaire en inhibant la réponse cytotoxique induite par la microglie (Louie et al. 2013).

Les RD sont donc des suppresseurs de tumeur et leur ligand possède un fort potentiel oncogénique. Leurs voies de signalisations sont par conséquent fréquemment dérégulées dans les tumeurs par des mécanismes favorisant la voie positive induite par le ligand et/ou inhibant la mort cellulaire induite par le RD. Restaurer la mort induite par les RD en interférant dans la liaison avec leur ligand est donc une stratégie thérapeutique potentielle pour la prise en charge des cancers présentant une surexpression du ligand. La société Netris Pharma développe actuellement des anticorps monoclonaux visant à interférer dans l'association entre les RD et leur ligand afin de déclencher l'apoptose des cellules tumorales.

Le couple DCC/nétrine-1 est la principale cible thérapeutique de Netris Pharma. Les caractéristiques de couple RD/ligand, qui a fait l'objet de mon travail de thèse, sont exposées ci-après.

4. DCC : entre développement neuronal et tumorigenèse

4.1. Généralités

DCC est l'acronyme de « Deleted in Colorectal Carcinoma », puisque ce gène fut tout d'abord identifié en tant que gène suppresseur de tumeur potentiel lors de la carcinogenèse colorectale. Le gène DCC est composé de 29 exons répartis sur 1,4 Mb du chromosome 18 chez l'Homme. Il code pour une glycoprotéine transmembranaire de 1447 acides aminés, composée de 4 domaines de type immunoglobuline et de six domaines fibronectine de type III, apportant à DCC une forte similarité avec les membres de la famille NCAM (neural cell adhesion molecule). DCC est, avec la famille des UNC5H, un des récepteurs de la nétrine-1.

4.2. DCC : entre suppresseur de tumeur et facteur de guidage axonal, l'objet d'une controverse

4.2.1. Découverte de DCC, gène suppresseur de tumeur putatif

Au début des années 1990, la recherche de gènes affectés par la perte somatique d'un allèle, qui était considérée comme un mécanisme d'inactivation des gènes suppresseurs de tumeur, mena à la découverte de fréquentes délétions sur le chromosome 18q. En effet, en comparant le génome de cancers colorectaux humains à des stades précoces à celui de néoplasies avancées, Vogelstein et al, ont observé que la partie 18q21 était spécifiquement perdue dans une large fraction d'adénocarcinomes colorectaux. Le fait que cette délétion ait lieu dans plus de 70% des cancers colorectaux était considéré comme une évidence de la présence d'au moins un gène suppresseur de tumeur non décrit dans ce locus. Une stratégie combinant marche sur chromosome, séquençage et observation de la perte allélique d'une région chromosomique particulière dans 71% des échantillons de cancers colorectaux issus de patients et 88% des lignées cellulaires de carcinomes colorectaux étudiés, a permis d'isoler une région de 370 paires de bases. Le clonage de cette région chromosomique a mené à l'identification d'un gène baptisé *Deleted in Colorectal Carcinoma* qui fut proposé comme potentiel gène suppresseur de tumeur (Fearon et al. 1990). Cette perte d'expression de DCC a de plus été corrélée à un potentiel métastatique pour les carcinomes du côlon.

En accord avec cette hypothèse, la perte du locus de DCC fut aussi observée plus tard dans de nombreux autres types de cancers comme les cancers hématologiques, les carcinomes de la vessie, de la prostate, du pancréas et des testicules. En plus de ceux-ci s'ajoutèrent les carcinomes du sein, de l'endomètre, les neuroblastomes, les glioblastomes dans lesquels une perte d'expression fréquente de DCC fut décrite.

En parallèle, des résultats compatibles avec le rôle suppresseur de tumeur de DCC ont commencé à s'accumuler *in vitro* et *in vivo*. En 1992, Narayanan et al ont montré que bloquer DCC avec un ARN anti-sens était suffisant pour transformer les fibroblastes Rat-1 *in vitro* : en effet, les cellules traitées présentaient un taux de croissance accéléré, une indépendance à la nécessité d'ancrage à un substrat et la capacité à induire des tumeurs dans des souris immunodéprimées. De plus, l'introduction d'une copie intacte du chromosome 18 dans une lignée de carcinome du colon ayant perdu l'expression de DCC suffit à inhiber les capacités tumorigéniques de ces cellules après greffes dans des souris immunodéprimées (Narayanan et al. 1992).

Au total, plus de 40 études concernant l'implication de DCC dans les cancers furent publiées entre 1990 et 1996, mettant en avant l'intérêt scientifique soulevé par l'identification de ce candidat durant cette période.

4.2.2. DCC : le récepteur à la nétrine-1 nécessaire au développement du système nerveux

Lors du développement embryonnaire, les axones provenant des neurones commissuraux doivent migrer de leur lieu de naissance, la zone ventriculaire à leur destination finale au sein du système nerveux (Figure 9). Les molécules de guidage permettent de diriger les axones vers leur cible. Ainsi, chez les Vertébrés, les neurones commissuraux dont le corps cellulaire est situé du côté dorsal projettent leur axone vers le côté ventral de l'embryon. L'orientation de l'axone vers sa cible finale est dirigée par des cellules de la plaque du plancher qui émettent des facteurs de guidage captés par les récepteurs de surface sur le cône de croissance situé à l'extrémité de l'axone.

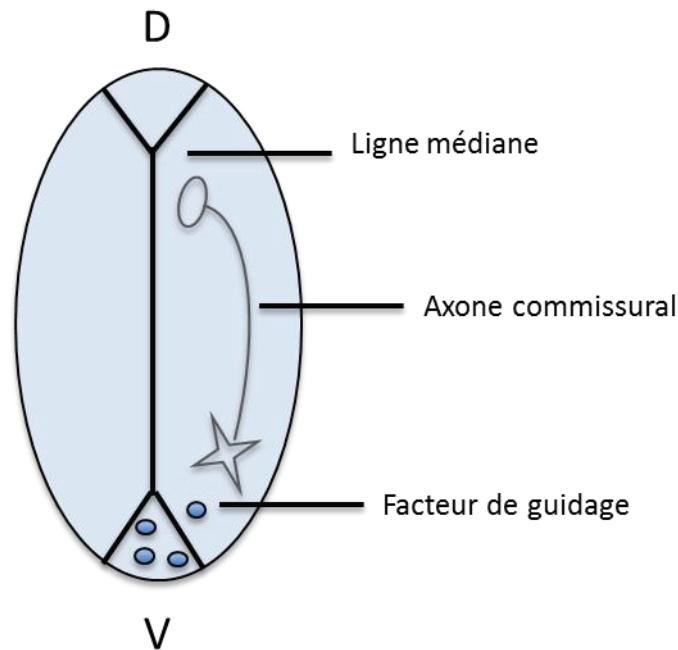


Figure 9 : Schéma de la projection des axones commissuraux (Figure originale). Les facteurs de guidage sécrétés par la plaque du plancher, permettent le ciblage des axones commissuraux du côté dorsal (D) vers le côté ventral (V) de l'embryon.

En 1996, deux articles apportèrent un nouvel éclairage sur la fonction de DCC. L'équipe de Marc Tessier-Lavigne établit tout d'abord une corrélation entre les défauts de migration ventrale des axones commissuraux observés dans les mutants UNC-6 de *C. elegans* (orthologue de la nétrine-1) et ceux du mutant UNC-40 (orthologue de DCC). En effet, chez le nématode, l'orthologue de la nétrine-1, UNC-6 (pour Uncoordinated) est sécrété par les cellules ventrales afin de permettre le guidage des neurones circonférentiels. UNC-40 est exprimé par le cône de croissance et favorise le guidage ventral en transcrivant un effet attractif d'UNC-6, alors qu'il co-induit un effet répulsif d'UNC-6 du côté dorsal en présence de l'autre récepteur UNC-5. UNC-6 permet de moduler notamment les protrusions du cône de croissance afin de diriger le prolongement des axones dans les territoires appropriés (Norris et Lundquist 2011). Dans le même temps, l'équipe de Culotti confirma l'expression de UNC-40 dans le système nerveux notamment au niveau des précurseurs neuronaux et des neurones sensoriels. Ils apportèrent une nouvelle réponse en démontrant que si le facteur UNC-6 a un effet attractif en présence de UNC-40, il a au contraire un effet répulsif sur les axones lorsqu'ils expriment à la fois UNC-40 et UNC-5, identifié chez le nématode (Chan et al. 1996). L'étude de la mise en place des connexions neuronales chez *C. elegans* a donc permis de mettre en lumière un rôle tout autre que celui de suppresseur de tumeur putatif pour DCC et son orthologue UNC-40.

C'est également en 1996 que l'orthologue de DCC, Frazzled, a été découvert chez la drosophile. Les mutants invalidés pour Frazzled présentent des défauts de guidage au niveau du système nerveux central et des motoneurones similaires à ceux observés chez *C. elegans* (Kolodziej et al. 1996). De la même façon que chez *C. elegans*, le couple

netrin/Frazzled permet l'attraction des neurones et la régulation du passage de la ligne médiane (Garbe et Bashaw 2007). Une autre fonction de Frazzled semble être importante chez la *Drosophile* en régulant l'expression de l'ARNm du gène *Commisssureless* (*Comm*). *Comm* est exprimé à un moment très spécifique : lorsque les axones commissuraux passent la ligne médiane, pas avant, pas après. Il permet de réduire la sensibilité des axones à *Slit* le temps qu'ils passent la ligne médiane. Il a été récemment montré que le domaine intracellulaire de Frazzled devient après clivage du récepteur par les g-sécrétases un facteur de transcription régulant l'ARNm de *Comm* permettant ainsi de réguler la sensibilité des axones à la répulsion du couple *Slit-Robo* (Neuhaus-Follini et Bashaw 2015). Les modalités de régulation du développement par le couple DCC/nétrine-1 sont donc complexes avec un rôle potentiellement très large.

Chez les Vertébrés, les premiers résultats de la caractérisation du rôle du couple nétrine-1/DCC ont été obtenus chez le rat. Faisant l'hypothèse d'un rôle de DCC dans la structuration du système nerveux central, ils ont constaté que DCC est en effet exprimée par les axones commissuraux chez le rat. De manière intéressante, il a ensuite été prouvé dans un modèle d'explants de moelle épinière chez cet animal que l'ajout d'un anticorps dirigé contre le domaine extra-cellulaire de DCC bloque la croissance des axones commissuraux normalement induite par la nétrine-1.

Le modèle de souris invalidées pour DCC a permis à l'équipe de Fazeli de confirmer le rôle du récepteur dans la signalisation induite par la nétrine-1 *in vivo* à l'aide d'un modèle murin. L'invalidation homozygote de DCC chez la souris est létale après la naissance et provoque des défauts de la trajectoire des axones commissuraux aux stades E 9,5-11,5 : les souris *DCC*^{-/-} présentent un nombre réduit d'axones projetant vers la plaque du plancher. Au niveau de la moelle épinière ventrale, les auteurs ont observé une trajectoire aberrante des axones commissuraux avec des défauts analogues à ceux des souris invalidées pour la nétrine-1. Les souris invalidées pour DCC présentent également, exactement comme les souris invalidées pour la nétrine-1, des défauts au niveau du corps calleux et de la commissure hippocampale ou une hypoplasie du nerf optique dus à des anomalies de projection (Fazeli et al. 1997). La liaison de la nétrine-1 sur DCC induit une signalisation positive par recrutement de ERK1 et ERK2 menant ainsi à l'activation des MAPK favorisant la survie de l'axone (Duman-Scheel 2009). L'interaction entre la nétrine-1 et son récepteur DCC permettrait également un remodelage du cytosquelette par une régulation très fines de Rho GTPases comme RhoA (Antoine-Bertrand, Fu, et Lamarche-Vane 2016). De manière similaire aux observations réalisées chez *C. elegans*, la nétrine-1 peut également se lier aux récepteurs de la famille des UNC5H, orthologue de UNC-5 chez les Vertébrés a, sur le guidage axonal, un effet opposé en fonction des récepteurs présents à la surface du cône de croissance : lorsqu'elle rencontre un homodimère de DCC, la nétrine-1 a un effet attractif alors que si elle trouve un hétérodimère composé de DCC et UNC5H elle aura un effet répulsif sur les neurones. Ces résultats ont permis de montrer que le couple nétrine-1/DCC joue un rôle sur la structuration du SN, en tant qu'acteur du guidage axonal et de la migration neuronale, et que cette fonction a été conservée au cours de l'évolution.

4.2.3. DCC gène suppresseur de tumeur : les éléments du doute

Le rôle majeur de DCC dans la mise en place du SN et, surtout, l'analyse de la prédisposition à la formation de tumeurs du modèle murin de Fazeli et al, dans lequel l'expression de DCC est inhibée par invalidation de l'exon 3, ont conduit à remettre en cause la fonction suppresseur de tumeur de DCC. En effet, l'invalidation hétérozygote de DCC ne suffit pas à augmenter l'incidence ou l'agressivité tumorale, spontanément au cours du vieillissement ou dans un modèle de prédisposition aux cancers colorectaux, induit par mutation du gène APC (Fazeli et al., 1997). La même année, un nouveau suppresseur de tumeur effecteur de la voie du TGF β fut identifié dans la même région 18q21.1 que DCC et nommé SMAD4/DPC4 (Deleted in Pancreatic Carcinoma-4). Les résultats obtenus par Fazeli, la découverte de SMAD4 et le fait que très peu de mutations somatiques de DCC soient retrouvées dans les cancers ont laissé penser que la perte de DCC était un phénomène passager plutôt qu'un élément causal dans la tumorigenèse.

4.2.4. DCC en tant que gène suppresseur de tumeur : réhabilitation d'un déchu

En 1998, la découverte par Mehlen et Bredesen que DCC appartient à la famille des RD apporta un nouvel éclairage sur sa fonction éventuelle de suppresseur de tumeur. Ils montrèrent *in vitro* que DCC peut induire l'apoptose dans des cellules humaines de carcinomes du côlon et que ce mécanisme requiert le clivage de DCC par les caspases sur son acide aminé 1290. En revanche, l'ajout de nétrine-1 par co-expression ou par protéine recombinante empêche le clivage de DCC par les caspases et bloque ainsi la mort cellulaire induite par le récepteur (P. Mehlen et al. 1998). La caractérisation de DCC en tant que RD ouvrit de nouvelles perspectives quant à sa fonction potentielle de gène suppresseur de tumeur conditionnel.

L'étude de Fazeli sur le rôle de DCC dans la tumorigenèse avait uniquement été conduite sur des animaux hétérozygotes puisque les animaux DCC^{-/-} meurent prématurément 24h après la naissance. En 2011, trois modèles animaux alternatifs, permettant d'étudier l'impact d'une invalidation homozygote de DCC, permirent d'asseoir une fois pour toute son rôle de suppresseur de tumeur.

Chez la drosophile, un mutant perte de fonction de Frazzled (Fra) a été utilisé pour étudier le rôle de cet orthologue de DCC dans la structuration des disques imaginaux. Les disques imaginaux sont des amas cellulaires issus du blastoderme donnant, lors de la métamorphose, les structures adultes (œil, patte, antenne, aile). Il est possible grâce à ce modèle de cultiver des clones exhibant des mutations spécifiques afin de modéliser la tumorigenèse. Or, les cellules des mutants Fra présentent une augmentation de leur capacité proliférative par rapport à celles issues de disques de drosophiles sauvages. De plus, des marqueurs cellulaires phénotypiques caractéristiques des cellules cancéreuses comme une perte de la polarité apico/basale ainsi qu'une réorganisation du cytosquelette d'actine ont également été observés en absence de Fra. Enfin, la perte de Fra augmente le

pouvoir invasif des cellules et leur capacité à dégrader la lame basale (VanZomerén-Dohm et al. 2011).

Simultanément, Krimpenfort et al ont développé un modèle knock-out (KO) conditionnel de DCC chez la souris, afin d'évaluer l'impact de son invalidation homozygote, dans un modèle de tumorigenèse mammaire induit par mutation de TP53. Dans ce modèle, l'inactivation de DCC conduit à un accroissement significatif de l'incidence des métastases pulmonaires (Krimpenfort et al. 2012).

Partant du constat que DCC nécessite pour induire l'apoptose un clivage par les caspases sur son acide aminé D1290, un modèle de souris dans lequel l'apoptose induite par DCC est spécifiquement inhibée par une mutation (D1290N) sur ce site de clivage a été créé au laboratoire. Dans un contexte APC prédisposé au développement de tumeurs intestinales, les souris $DCC^{D1290N/D1290N}$ présentent une hausse de l'incidence de la fréquence et de l'agressivité des tumeurs intestinales par rapport aux souris contrôles. Cette étude a donc permis d'asseoir le rôle de DCC en tant que suppresseur de tumeur, limitant la progression tumorale plutôt qu'en tant que déclencheur du processus tumoral.

Ces modèles animaux réunis plaident clairement en faveur d'un rôle suppresseur de tumeur de DCC *in vivo*, résultant en partie du moins de sa capacité à induire l'apoptose en absence de nétrine-1. L'importance de DCC dans le contrôle de la tumorigenèse chez l'Homme reste cependant à démontrer.

La dualité de fonction de DCC en tant que RD permet donc de concilier le rôle de DCC en tant que récepteur au facteur de guidage nétrine-1 dans le développement neuronal et sa fonction de suppresseur de tumeur dans les cancers en induisant l'apoptose dans un contexte limité en ligand.

4.3. Le couple DCC/nétrine-1 potentielle cible thérapeutique ?

DCC étant un gène suppresseur de tumeur dont l'activité apoptotique est inhibée par la présence de son ligand, interférer dans la liaison entre le RD et son ligand pourrait être un moyen de restaurer la mort des cellules tumorales. Cette hypothèse paraît d'autant plus intéressante que la nétrine-1 est surexprimée et agit comme un facteur de survie dans les cancers métastatiques du sein, les cancers du poumon non à petites cellules, les cancers de l'ovaire, les cancers pancréatiques, les cancers colorectaux associés à l'inflammation ou les neuroblastomes (Patrick Mehlen, Delloye-Bourgeois, et Chédotal 2011).

Une stratégie thérapeutique basée sur le blocage de l'interaction de la nétrine-1 sur ses RD a été testée par l'équipe de Patrick Mehlen. Dans le cas d'un modèle murin de cancer colorectal associé à l'inflammation, induit par injections d'AOM/DSS, l'utilisation d'un peptide correspondant au 4^e domaine fibronectine de DCC, capable d'interagir avec la nétrine-1 et d'inhiber sa capacité à bloquer la mort induite par DCC, diminue l'agressivité tumorale, avec une hausse de la fréquence des adénomes de bas grade et une forte diminution des adénomes de haut grade et adénocarcinomes. Dans ce cas-là, le couple

DCC/nétrine-1 semble donc être impliqué dans la progression plutôt que dans l'initiation tumorale. Il a de plus été montré que l'augmentation de l'expression de la nétrine-1, dans ces cancers liés à l'inflammation, est due à la régulation positive par la voie NFkB (Paradisi et al. 2009).

La preuve de concept de l'efficacité anti-tumorale d'un blocage de la liaison nétrine-1/récepteurs a été apportée dans différents types de cancers mais uniquement *via* réinduction de l'apoptose par les récepteurs UNC5H. En effet, interférer entre la nétrine-1 et ces récepteurs diminue la croissance tumorale dans des modèles de xénogreffes murines de cancers du sein métastatiques, de neuroblastomes ou encore de cancers du poumon non à petites cellules (Gibert et Mehlen 2015). La preuve de concept de l'efficacité d'un blocage spécifique entre la nétrine-1 et DCC restait à faire au début de ma thèse.

Par ailleurs, une étude sur les effets des agents chimiothérapeutiques classiques (Doxorubicine, 5-Fluorouracil, Paclitaxel, Cisplatine) a permis de mettre en évidence que le traitement de cellules avec ces drogues se traduit par une augmentation de l'expression du ligand et de ses récepteurs dans ces lignées, sans aucun lien cependant avec la résistance ou non des cellules aux drogues. De manière intéressante, interférer dans la liaison entre la nétrine-1 et ses récepteurs potentialise la mort cellulaire induite par les chimiothérapies dans les lignées cellulaires. Il serait donc intéressant de pouvoir utiliser ce genre d'agent interférant chez l'Homme puisque potentialiser la mort induite par les agents chimiothérapeutiques pourrait permettre de diminuer les doses utilisées et donc les nombreux effets secondaires indésirables (Paradisi et al. 2013).

L'équipe de Patrick Mehlen a également montré très récemment un rôle pour le couple DCC/nétrine-1 dans la reprogrammation des cellules souches pluripotentes induites (iPS) qui sont un excellent modèle d'étude *in vitro* des mécanismes nécessaires à la reprogrammation. La nétrine-1 semble être un facteur important dans ce phénomène puisqu'inhiber la nétrine-1 à l'aide d'un shARN diminue l'efficacité de génération des cellules iPS. Inhiber DCC en même temps que la nétrine-1 restaure l'efficacité de reprogrammation. L'utilisation du modèle de souris D1290N dans lequel DCC est muté sur son site de clivage pour les caspases et utilisé dans le contexte de la tumorigenèse colorectale a permis de mettre en évidence que les cellules de fibroblastes embryonnaires dans lesquelles la fonction apoptotique de DCC est inhibée forme plus de colonies de cellules iPS. Il semblerait donc que le couple DCC/nétrine-1 soit impliqué dans la reprogrammation des cellules iPS en partie grâce au blocage de la fonction apoptotique de DCC par la nétrine-1 (Ozmadenci et al. 2015).

Ces résultats ouvrent des perspectives larges et posent la question d'un éventuel rôle du couple DCC/nétrine-1 dans le développement et la survie des cellules souches cancéreuses. Il reste cependant à trouver un système adapté pour résoudre cette problématique. En effet, vu l'importance grandissante des données impliquant les cellules souches dans la tumorigenèse, il serait intéressant d'étudier le rôle du couple nétrine-1/DCC dans le maintien des cellules souches cancéreuses.

Il a été formellement montré que DCC est un suppresseur de tumeur grâce à différents modèles animaux. Son ligand nétrine-1 est quant à lui oncogénique, *via* DCC mais

également ses autres récepteurs UNC5H, et favorise la tumorigenèse dans différents types de cancers. Il semble donc intéressant de cibler la liaison entre la nétrine-1 et ses récepteurs pour rétablir l'apoptose induite par les RD. Cependant, si la preuve de concept de l'efficacité de cette stratégie a été apportée *in vitro* et *in vivo* chez la souris, elle manquait pour DCC au début de ma thèse, puisque l'efficacité anti-tumorale des composés testés *in vitro* résultait d'une réactivation de la mort induite par les récepteurs UNC5H. Dans ce contexte, les objectifs de mon travail de thèse étaient de :

- Démontrer le rôle de suppresseur de tumeur de DCC chez l'Homme. En effet, Il a été montré que l'expression de DCC est dérégulée dans les cancers colorectaux chez l'homme et son rôle de suppresseur de tumeur formellement démontré dans ce type de cancers dans un modèle murin. On peut émettre la supposition que la signalisation apoptotique de DCC est dérégulée dans d'autres types de cancers. Le but est donc de chercher à définir si le blocage de la signalisation apoptotique induite par DCC pourrait jouer un rôle causal dans la survenue d'autres types de cancers. Mieux comprendre son implication dans les cancers humains permettrait dans un second temps de développer des stratégies thérapeutiques pouvant restaurer l'apoptose induite par ce récepteur. Nous nous sommes concentrés sur les lymphomes afin de définir s'il existait outre la perte de DCC déjà décrite dans certains lymphomes, un gain de nétrine-1 dans une fraction de ces cancers.
- Clarifier les partenaires de DCC. Les modalités de régulation de l'apoptose induite par DCC restent floues à l'heure actuelle avec très peu de partenaires protéiques décrits. Nous avons cherché à définir s'il existe des modes de régulation de l'interaction DCC/nétrine-1 pouvant potentialiser le rôle de suppresseur de tumeur de DCC. Chez *C. elegans*, l'orthologue de DCC, UNC-40 interagit avec MADD-4. Il est donc possible que les orthologues de MADD-4, ADAMTSL1/3 puissent interagir avec DCC chez l'Homme.

Ces deux parties, étant indépendantes entre elles, font l'objet d'une introduction spécifique ci-après, avant présentation des résultats obtenus.

RESULTATS

PARTIE 1 : Implication du couple nétrine-1/DCC dans la survenue de lymphomes à cellules B

I. Qu'est-ce qu'un lymphome ?

1. Généralités

Le terme « lymphome » couvre un groupe hétérogène de néoplasies du tissu lymphoïde se développant dans des sites nodaux ou extra-nodaux à partir d'un lymphocyte, qu'il soit de type B ou T. La présentation clinique classique d'un lymphome est celle d'une adénopathie persistante avec un ou des ganglions présentant une taille supérieure à 1,5 cm de diamètre. Les patients peuvent également présenter une sensation de compression de la cage thoracique ou de l'abdomen en fonction de la localisation du lymphome et, de façon plus générale, une altération de la condition physique (fatigue, suées, essoufflement).

On peut distinguer deux grandes familles de lymphomes :

- Les lymphomes de Hodgkin (LH), qui furent les premiers découverts, caractérisés par la présence de grandes cellules atypiques : les cellules géantes multinuclées de Reed-Sternberg.
- Les lymphomes non hodgkiniens (LNH), baptisés ainsi par défaut, regroupant tous les autres types de lymphomes.

L'incidence et la survie sont très variables en fonction des familles de lymphomes :

- Les lymphomes hodgkiniens présentent une incidence de 2,2/100.000 cas et ont une issue plutôt favorable avec une survie à 5 ans de 85%. Sur le plan étiologique, les patients infectés par le virus d'Epstein-Barr et/ou le VIH présentent une incidence augmentée de LH.
- Les lymphomes non Hodgkiniens ont une incidence bien plus élevée de 8,9/100.000 cas et une survie à 5 ans plus faible de 54%. Les LNH sont de plus en plus fréquents dans le monde, en particulier dans les pays développés avec, en France, 10 000 nouveaux cas détectés chaque année, ce qui fait des LNH le 6^e cancer le plus répandu chez l'adulte. Les patients ayant suivi un traitement immunosuppresseur ont un risque plus élevé de développer un LNH. De même, les infections virales de type VIH-1, VTLH-1 ou VEB sont un facteur étiologique fréquemment associé au LNH (Stewart et Kleihues 2005).

Nous nous concentrerons ici sur les LNH, qui ont fait l'objet de mon travail de thèse et regroupent une trentaine de sous-types très variés, subdivisés en deux entités principales : les néoplasies originaires d'un lymphocyte B (LB) et celles dérivant d'un lymphocyte T (LT).

2. Les lymphomes à cellules T (LCT)

La classification de 2008 de l'Organisation Mondiale pour la Santé, regroupe dans un même sous-type, les LCT et les lymphomes originaires d'une cellule NK (Natural Killer), puisque ces deux types de cellules partagent beaucoup de similitudes d'un point de vue développemental. Ces lymphomes, plutôt rares, représentent seulement 10% des LNH. Le plus courant de ces lymphomes est le lymphome périphérique à cellule T, sans autre précision particulière, car diagnostiqué par exclusion (T-cell lymphome, not otherwise specified, abrégé en PTCL-NOS). Il représente 25% des cas, suivi de près par le lymphome à cellule-T angioimmunoblastique avec 18,5% des patients. On retrouve également les lymphomes anaplasiques à grandes cellules, les lymphomes T à présentation cutanée ainsi que les lymphomes T extra-ganglionnaires.

Les PTCL-NOS sont prévalents chez les hommes (ratio 2 :1) à partir d'une soixantaine d'années. Ils sont généralement nodaux mais également extra-nodaux dans 13% des cas localisés sur la peau ou dans le tractus gastro-intestinal. Ils sont pour la plupart agressifs, c'est à dire se développant rapidement avec une tendance à se propager aux ganglions lymphatiques. La stratégie thérapeutique pour les PTCL a été longtemps similaire à celle utilisée pour les lymphomes diffus à grandes cellules B (LDGC-B), avec un résultat très médiocre puisque la survie à 5 ans est comprise entre 10 et 38,5%, dû à une grande résistance aux chimiothérapies conventionnelles. La première ligne de thérapie actuelle repose sur la combinaison d'agents chimio-thérapeutiques, Cyclophosphamide, Doxorubicine, Vincristine et Prednisone (CHOP). Des stratégies innovantes se développent avec l'utilisation de nouveaux traitements, tels que les anticorps monoclonaux anti-CD52 afin de supprimer l'immunité (T CD4, CD8 et lymphocytes B), des anti-CD4 présents dans certains sous-types de PTCL, ou des inhibiteurs de déacétylases des histones (chidamide, romidepsin) visant à améliorer l'action du protocole CHOP. Comme dans de nombreux cancers, différentes voies de signalisation comme celles activant NFkB ou mTOR semblent dérégulées dans les PTCL laissant penser qu'un traitement individualisé ciblant la/les voies altérées chez chaque patient reste la meilleure approche à avoir dans l'avenir (Zhang et al. 2016).

3. Les lymphomes à cellules B (LCB)

3.1. Généralités

Le terme LCB regroupe un ensemble très hétérogène de cancers ayant comme point commun une dérégulation de différentes voies de signalisation favorisant la survie et l'expansion de cellules B transformées.

La nomenclature des différents types de LCB est fonction de l'état de maturation de leur cellule d'origine, issue du lignage des lymphocytes B. Les LB sont des effecteurs de l'immunité adaptative, capables de reconnaître spécifiquement un antigène grâce à leur

immunoglobuline de surface, le BCR. La différenciation et la maturation du lymphocyte B commence dans la moelle osseuse, en l'absence de stimulation antigénique. Le LB subit une suite de réarrangements des gènes codant pour son BCR, permettant de faire évoluer les chaînes d'immunoglobulines le composant et assurant ainsi la diversité des BCR antigènes potentiellement reconnaissables par l'organisme. Au cours de ce processus de différenciation, se succèdent les stades de progéniteurs lymphoïdes communs, pré-pro-B, pro-B puis pré-B avant d'atteindre le stade B immature. Les LB immatures subissent un processus de sélection, au cours duquel les cellules possédant des immunoglobulines membranaires spécifiques du Soi sont éliminées. Les LB naïfs survivants quittent la moelle osseuse pour atteindre les organes lymphoïdes secondaires (ganglions, rate, Mucosa Associated Lymphoid Tissue MALT), afin de finir leur maturation. Ils circulent dans le système lymphatique jusqu'à ce qu'ils reconnaissent un antigène spécifique de leur BCR. Après rencontre avec un lymphocyte T, le lymphocyte B va migrer de la zone du manteau au follicule dans lequel il va former une structure particulière des organes lymphoïdes secondaires : le centre germinatif (CG). Le centre germinatif est divisé en deux zones distinctes (Figure 10) :

- La zone sombre contenant des centroblastes à haut caractère prolifératif, caractérisée par une forte densité cellulaire, à l'origine du nom de cette zone, subissant des modifications génétiques des gènes d'immunoglobulines (hypermutations somatiques) de manière à optimiser la reconnaissance d'antigènes.
- La zone claire dans laquelle les centrocytes, lymphocytes ne proliférant plus sont sélectionnés selon leur affinité avec l'antigène grâce à la présence de nombreuses cellules folliculaires dendritiques.

Une fois sélectionné, le LB va alors soit :

- Retourner, dans la zone sombre afin de subir un second cycle de maturation (Basso et Dalla-Favera 2015). Le transit du LB dans le CG est notamment placé sous le contrôle du gène *MYC* qui est exprimé de façon bimodale, avant et après que le LB soit passé dans la zone sombre. Une fois dans la zone sombre, l'expression de *MYC* est immédiatement inhibée par le répresseur transcriptionnel Bcl-6 (B-Cell Lymphoma 6). Un LB peut cycliquement transiter entre la zone sombre et la zone claire autant de fois que nécessaire pour améliorer l'affinité du BCR ;
- Se différencier en cellule B mémoire ;
- Se différencier en plasmocyte, capable de sécréter des anticorps.

Le mécanisme d'hypermutations somatiques (HMS) grâce auquel des mutations ponctuelles sont introduites dans les régions variables des chaînes lourdes et légères du BCR, permet de générer un large répertoire d'anticorps et d'augmenter l'affinité du BCR. Il est associé à des cassures double-brin de l'ADN, induisant ainsi des mutations ponctuelles lors du processus de réparation. Les processus d'HMS, de prolifération et de sélection clonale ayant lieu dans la zone sombre du CG ont un potentiel oncogénique élevé, puisqu'on assiste à des modifications sur les brins d'ADN ou à des dérégulations de facteurs de transcription comme Bcl-6.

Partie 1 : Implication du couple nétrine-1/DCC dans la survenue de lymphomes à cellules B

Il suffit donc d'un emballement de la machinerie d'un ou plusieurs de ces mécanismes pour que le LB acquiert des capacités de résistance à l'apoptose (par surexpression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 notamment) ou de prolifération incontrôlée. Il n'est donc pas étonnant que la plupart des LCB provienne d'une cellule B du CG. Les lymphomes du manteau, par exemple, semblent être le pendant tumoral du lymphocyte B en transit dans la zone mantellique avant qu'il n'entre dans le centre germinatif. Les lymphomes diffus à grandes cellules B (LDGC-B) en revanche proviennent d'un lymphocyte B ayant déjà été en contact avec le centre germinatif.

Sur le plan histologique, certains sous-types de LB sont très similaires et donc impossible à différencier. Des études des profils d'expression ont permis de définir plusieurs sous-groupes afin de les discerner. De manière intéressante, ces études ont mis en valeur le fait que chaque LB a un profil génétique et phénotypique ressemblant fortement à une cellule B à un certains stade de différenciation, c'est la théorie de la « cellule d'origine » (Shaffer, Young, et Staudt 2012).

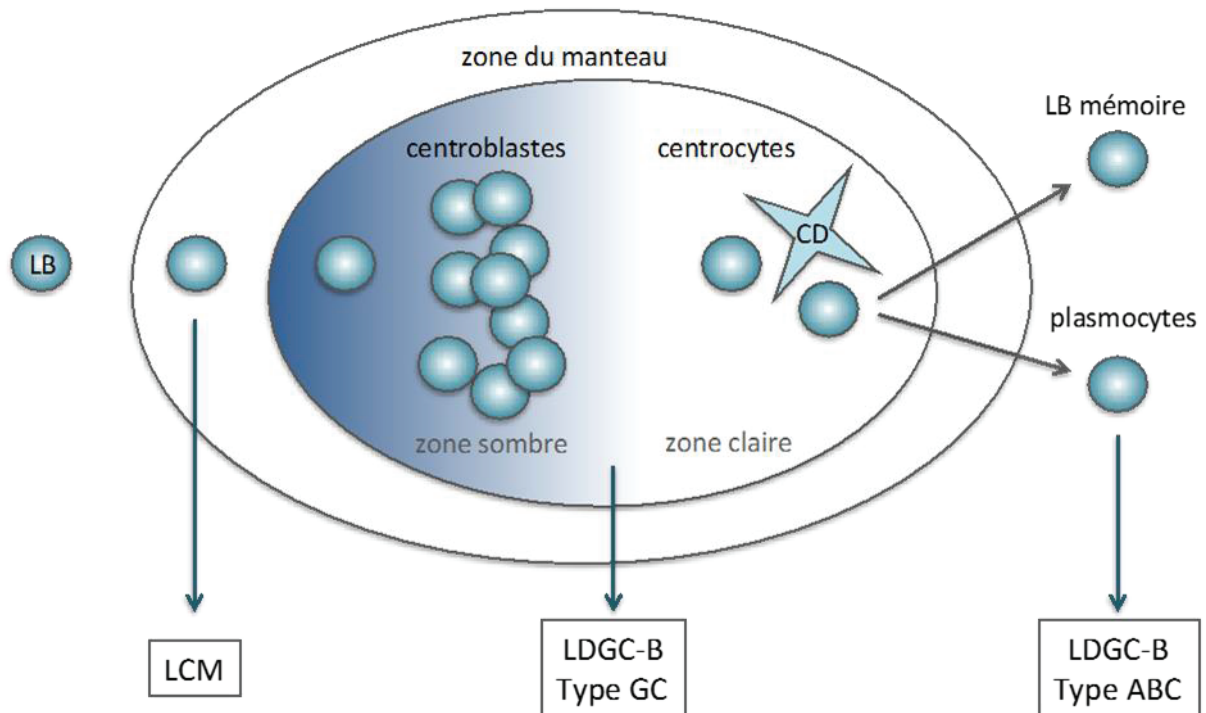


Figure 10 : Fonctionnement du centre germinatif, structure transitoire des organes lymphoïdes secondaires (Figure originale). Une fois dans le ganglion lymphatique, le LB migre de la zone du manteau au centre germinatif dans lequel les centroblastes vont proliférer et subir des hypermutations somatiques. Les centrocytes de la zone claire sont sélectionnés en fonction de leur affinité pour l'antigène par les cellules dendritiques (CD). Ils sortent ensuite du CG pour devenir LB mémoire ou plasmocyte producteur d'anticorps. Les encadrés représentent la contrepartie lymphomateuse de chaque étape de différenciation.

3.2. Quelques exemples de LCB

a) Le lymphome diffus à grandes cellules B

Le lymphome diffus à grandes cellules B est le LNH le plus fréquent et représente entre 30 et 40% des cas. C'est un lymphome présentant une dispersion des grandes cellules qui le composent dans les ganglions et le système lymphatique, d'où sa dénomination. Il est agressif avec une évolution très rapide, qui se fait le plus souvent en quelques semaines à quelques mois. Il arrive que certains lymphomes indolents avec un taux de prolifération très bas, comme les lymphomes du MALT ou les lymphomes folliculaires, se transforment en LDGC-B. Sur le plan génétique, ils contiennent des gènes réarrangés pour les immunoglobulines ainsi que des mutations caractéristiques des hypermutations somatiques, laissant penser qu'ils proviennent d'un LB du centre germinatif ou à un stade encore plus tardif de différenciation. Les LDGC-B sont morphologiquement impossibles à différencier alors qu'on retrouve une grande hétérogénéité du point de vue de la réponse aux traitements de chaque patient. En 2000, un profilage d'environ 3500 gènes a permis de dresser un portrait moléculaire plus précis des LDGC-B et de différencier deux sous-types majeurs : les LDGC-B de type centre germinatif (GC) et les LDGC-B à Cellule B Activée (ABC, Activated B-Cell) (Alizadeh et al. 2000). Les LDGC-B de type GC ont une signature génétique de cellule B du centre germinatif, alors que les LDGC-B de type ABC les expriment à un taux très bas voire indétectable, laissant penser que leur LB d'origine a terminé son séjour dans le centre germinatif. Un des gènes spécifiquement surexprimé dans les LDGC-B de type GC est le gène Bcl-6 qui est nécessaire à la formation du centre germinatif et répresseur transcriptionnel de plusieurs gènes impliqués dans la prolifération, la survie et la croissance cellulaire (Basso et Dalla-Favera 2010), ainsi que le gène Bcl-7A fréquemment transloqué dans les LNH. Pour le sous-type ABC, on retrouve une signature spécifique de gènes critiques pour la prolifération des lymphocytes B, comme IRF4 ainsi que des gènes anti-apoptotiques comme FLIP, qui est un dominant négatif de la caspase 8. On observe également une surexpression de Bcl-2, avec un niveau 4 fois supérieur à celui retrouvé dans les LDGC-B de type GC en moyenne, quoique dans 30% des cas, Bcl-2 soit aussi surexprimé dans le type GC. Finalement, une activation constitutive du facteur de transcription NFkB est également caractéristique du type ABC (Davis et al. 2001).

Ces différences moléculaires révèlent l'étiologie différente des deux types de LDGC-B, ce qui est à mettre en lien avec le pronostic différent des deux entités. En effet, 76% des patients atteints de LDGC-B de type GC étaient en vie après 5 ans, alors que ce taux chute à 16% lorsque le LDGC-B est de type ABC. Il y a donc une importance majeure à traiter ces deux sous-types de LDGC comme deux entités distinctes (Alizadeh et al. 2000).

A partir des années 1970, la chimiothérapie utilisée contre les LDGC-B était à base d'anthracycline. L'arrivée du régime CHOP n'a pas changé l'efficacité des traitements, mais a apporté une toxicité moindre. Le Rituximab, anticorps monoclonal chimérique ciblant la molécule de surface CD20 spécifique des cellules B, utilisé en combinaison avec

la chimiothérapie de type CHOP (R-CHOP) a permis d'augmenter la survie à 10 ans des patients de 27,6 à 43,5% (Roschewski, Staudt, et Wilson 2014). C'est maintenant le régime utilisé le plus classiquement contre les LDGC-B. Bien que les sous-types GB et ABC aient un pronostic vital complètement différent, il n'y a pour le moment pas de prise en charge de routine différente pour ces deux catégories de LDGC-B. On peut recenser différents essais cliniques ayant pour but de traiter de façon distincte ces deux entités en fonction de leurs particularités génétiques. Dans le cas des LDGC de type GC, dont le taux de rechute reste malgré tout élevé, on trouve notamment un essai clinique portant sur l'histone-lysine méthyltransférase EZH2, qui est mutée (mutation gain de fonction) dans 22% des cas de LDGC de type GC. EZH2 est un des régulateurs qui promeut la lymphomagenèse des LDGC-B, en réprimant des gènes anti-prolifératifs comme CDKN1A. Des molécules anti-Bcl-2 (gène anti-apoptotique), Bcl-6 ou de la voie PI3K/AkT/mTOR sont également en cours de développement et d'essais cliniques. Dans les LDGC de type ABC, la majorité des essais expérimentaux portent sur l'inhibition de la voie NFκB, spécifiquement dérégulée dans ce sous-type de LDGC avec des agents comme le bortezomib, le carfilzomib (inhibiteur du protéasome induisant un arrêt du cycle cellulaire) ou encore le lenalidomide.

Il existe un 3^e sous-type de LDGC-B : le lymphome primitif médiastinal à grandes cellules B (LPMB) qui apparaît dans les ganglions localisés au niveau du thorax (médiastin). Sur le plan génétique, ils possèdent une signature de cellule B mature, avec une amplification de la région chromosomique 9p24 contenant les gènes PD-L1, PD-L2 et JAK2. PD-L1 et PD-L2 permettent d'activer la mort induite par PD-1, inhibant l'activation des cellules T (Roschewski, Staudt, et Wilson 2014). Le traitement le plus utilisé pour les LPMB et permettant une guérison dans la plupart des cas est la combinaison de chimiothérapie R-CHOP en combinaison avec l'etoposide (DA-EPOCH-R).

b) Le Lymphome à cellules du manteau (LCM)

Le lymphome à cellules du manteau se développe sur le bord externe d'un ganglion lymphatique appelé zone du manteau et représente de 3 à 6% des LNH. Ce lymphome survenant à un âge médian de 60 ans est agressif avec un mauvais pronostic (survie médiane de 3 à 4 ans), car souvent diagnostiqué à un stade avancé III ou IV. Il présente dans 95% des cas une surexpression de la cycline D1 due à une translocation chromosomique t(11;14)(q13;q32), ainsi que des altérations génétiques au niveau de gènes de réparation de l'ADN comme *ATM* et *MDM2* (Cheah, Seymour, et Wang 2016). Chez les patients les plus jeunes, le traitement commence en général par une chimiothérapie agressive suivie d'une transplantation de cellules souches autologues. Grâce à la transplantation, la survie sans progression est passée de 17 à 39 mois par rapport à un traitement classique aux interférons. Chez les patients plus âgés ne tolérant pas la chimiothérapie intensive et la greffe autologue, la thérapie reste plus classique et consiste en l'utilisation du régime R-CHOP (R. Chen, Sanchez, et Rosen 2016). Différents traitements sont en cours de développement afin d'améliorer la survie des patients. On retrouve par exemple des combinaisons ou de nouveaux anticorps monoclonaux anti-

CD20 spécifiques des lymphocytes B (autre que Rituximab), tels que l'Ofatumumab ou Obinutuzumab. Les agents déméthylants semblent également prometteurs, comme le montre l'étude clinique en phase II menée sur 37 patients dans laquelle le Vorinostat est utilisé en combinaison avec le Rituximab et la Cladribine (Cheah, Seymour, et Wang 2016) : les patients présentent une survie sans progression à 18 mois de 82%. Cependant, il existe un différentiel de réponse selon l'âge, puisque la survie des jeunes patients est passée de 4 à 10 ans, alors qu'elle stagne toujours à 4 ans chez les patients âgés. Il est donc nécessaire de mieux comprendre les événements moléculaires menant au développement de LCM pour envisager des thérapies ciblées plus efficaces.

c) Une catégorie de lymphomes particulière : le Lymphome primaire extra-nodal à cellules B (LPEB)

Les LPEB regroupent une classe de lymphomes à cellules B bien particulière, puisqu'ils peuvent se développer dans des organes non lymphoïdes, même quand ceux-ci sont normalement dépourvus de lymphocytes. Loin d'être un sous-type de cancer rare, ils représentent 30 % des LNH et sont dans la majorité des cas de type LDGC-B d'un point de vue histologique, sauf dans le tractus gastro-intestinal où leur type est plus varié (LDGC-B, LCM, lymphomes folliculaires). Il est important d'insister sur le terme « primaire », puisqu'il permet d'exclure de cette catégorie les lymphomes nodaux de stade III et IV qui peuvent également se disséminer dans les sites extra-nodaux de façon secondaire. Bien qu'ils puissent en théorie se développer dans n'importe quel organe, le tractus gastro-intestinal, la peau, les testicules et le système nerveux central restent des sites privilégiés pour le développement de ces cancers (Vannata et Zucca 2015). Il est maintenant de plus en plus généralement reconnu que le site de développement des lymphomes extra-ganglionnaires reflète les caractéristiques de « homing » des populations lymphoïdes dont elles sont issues. Les caractéristiques des LPEB que ce soit en termes d'incidence, de dérèglements moléculaires ou de pronostic sont relativement différentes en fonction de leur organe de développement.

Les PCNSL (Lymphome primaire du système nerveux central) par exemple, se développent dans le système nerveux central. Cette localisation est plus que surprenante, puisque le cerveau est classiquement considéré comme un sanctuaire immunologique. Cette notion est cependant discutée, puisque de plus en plus de phénomènes immunitaires comme l'inflammation sont décrits dans le cerveau. On sait par exemple que le cerveau contient des cellules capables de présentation d'antigènes comme les astrocytes, les cellules de la microglie ou encore les péricytes. Il peut donc être caractérisé comme un lieu dans lequel le drainage lymphatique conventionnel est absent, mais pouvant contenir des lymphocytes B capables de passer la barrière hémato-encéphalique. Le cerveau d'un individu sain pourrait également contenir des lymphocytes B activés, mais en très petit nombre. Il n'y a cependant pas d'accumulation dans des zones préférentielles et on ne sait pas encore s'ils peuvent sortir du cerveau par la circulation, ou s'ils sont voués à y rester (Anthony, Crawford, et Bell 2003). Les PCNSL sont considérés comme incurables dans la plupart des cas et peuvent parfois être dus à une situation

d'immunodépression, comme une infection par le VIH, même si cela ne concerne qu'une minorité de cas. Ce type de tumeur présente un profil correspondant aux LDGC-B avec une signature moléculaire intermédiaire entre les sous-types ABC, avec des HMS plus précises en cours de réalisation. Il serait issu de lymphocytes B ayant déjà été en contact avec un centre germinatif dans les ganglions avant de migrer pour une raison encore inconnue dans le système nerveux central. D'un point de vue moléculaire, on retrouve dans les PCNSL une délétion du locus chromosomique 6p21 contenant notamment le locus HLA, ce qui constituerait un moyen d'échapper au contrôle immunitaire permettant au SNC de rester un site immun privilégié. La perte d'expression des gènes HLA semble être une caractéristique des LDGC-B se développant dans des sites extra-nodaux, puisqu'on la retrouve également dans les lymphomes primaires testiculaires (Booman et al. 2008).

Ces tumeurs présentent également une forte expression de Bcl-2, Bcl-6, MYC et une activation de la voie de signalisation NFκB par mutations de ces effecteurs. Les dérégulations génétiques ou facteurs favorables menant au développement de PCNSL autre que l'immunodéficiences restent pour le moment flou. Le traitement des PCNSL repose pour le moment sur une chimio-thérapie de type HD-MTX (High-Dose methotrexate), combinée à une radiothérapie complète du cerveau (Chamberlain et Johnston 2010). Le gros problème de ce type de thérapie réside dans les dangers de la neurotoxicité des traitements utilisés qui peuvent parfois induire la mort du patient sans évidence de la croissance active du lymphome. La survie à deux ans des patients peut varier de 80 à 15% en fonction du groupe de risque auquel appartient la tumeur (Ferreri, Dell Oro, et Reni 2003). Il est intéressant de noter que les PCNSL sont un type de tumeurs primaires qui restent confinées à leur premier site de développement ou qui, en cas de métastases, se disséminent uniquement au sein du SNC.

De même, après une greffe sous-cutanée de cellules primaires de PCNSL issue d'une patiente, les souris ne développent aucune tumeur mais de larges lymphocytes B intravasculaires présentant les mêmes marqueurs que ceux de la patiente sont retrouvés au niveau du cerveau de ces animaux. Il semble donc y avoir un tropisme particulier des lymphocytes B participant à la lymphomagenèse des PCNSL vers le cerveau. Des études génomiques comparatives entre les PCNSL et les lymphomes nodaux ont permis de mettre en évidence une modulation de gènes de la matrice extracellulaire avec entre autres une surexpression de l'ostéopontin et une diminution de l'expression du collagène de type VI. Aucun facteur susceptible d'expliquer ce homing sélectif n'a cependant encore été décrit de façon formelle.

4. Hypothèses et objectifs

Hypothèse : Comme décrit précédemment, le rôle de DCC en tant que suppresseur de tumeur colorectal a été démontré grâce au modèle murin dans lequel *DCC* est muté sur son site de clivage par les caspases D1290N et qui présentent une prédisposition à la tumorigenèse colorectale. Inhiber le clivage de DCC sur son site de clivage, et donc abolir sa fonction apoptotique, favorise la tumorigenèse colorectale. La perte d'expression de DCC a été décrite depuis longtemps dans de nombreux types de cancers, notamment dans les lymphomes à cellules B gastriques de haut grade par perte d'hétérozygotie et dans certains LNH (Starostik et al. 2000; Younes et al. 1995). De manière intéressante, une propension à développer des hyperplasies lymphoïdes et des lymphomes B a été observée dans les souris *DCC*^{D1290N} avant mon arrivée au laboratoire. Nous avons donc émis l'hypothèse qu'une dérégulation du contrôle apoptotique médié par le couple DCC/nétrine-1 pourrait être une des causes du développement et/ou du maintien des LNH et qu'il pourrait y avoir, en plus de la perte de DCC, un gain d'expression de la nétrine-1 dans une autre fraction de LNH.

Dans ce contexte, la première partie de mon travail de thèse a eu pour objectifs :

- d'analyser l'expression du couple DCC/nétrine-1 dans différents types de LNH (LCM, folliculaire, LDGC-b, extra-nodaux) afin définir si, dans certains de ces lymphomes, une perte ou un gain d'expression pouvait être retrouvé, conduisant à un déséquilibre de la signalisation apoptotique de DCC.
- de réaliser la preuve de concept de l'efficacité de l'anticorps pouvant bloquer l'interaction entre le récepteur et son ligand afin de rétablir l'apoptose induite par DCC et ainsi diminuer le volume tumoral.

5. Présentation des résultats

5.1. Implication du couple nétrine-1/DCC dans le développement de lymphomes diffus à grandes cellules B et de lymphomes du manteau

Résumé de la publication

L'utilisation du modèle murin D1290N, dans lequel DCC est muté sur son site de clivage pour les caspases, a permis de mettre en évidence que DCC est un gène suppresseur de tumeur dans les cancers colorectaux. En effet, lorsque DCC n'induit plus d'apoptose, les souris présentent une fréquence, une incidence et une agressivité augmentées des tumeurs intestinales relativement aux souris contrôles. Or, avant mon arrivée au laboratoire, ce modèle murin a également permis de montrer que le blocage de la fonction apoptotique de DCC favorise la survenue d'hyperplasies lymphoïdes et de lymphomes à cellules B au cours du vieillissement. En effet, à l'âge de 19 mois, 44.8% des animaux

mutés (DCC^{mut/mut}) développent des hyperproliférations lymphoïdes anormales contre 15.8% des souris contrôles (DCC^{+/+}). Ces lésions ont été observées majoritairement dans la rate et les ganglions et la clonalité de type B été prouvée par l'étude de la présence de réarrangements de la chaîne lourde d'immunoglobuline. Compte-tenu des arguments bibliographiques exposés ci-dessus et de ces résultats, nous avons cherché à définir si une dérégulation du contrôle apoptotique exercé par le couple DCC/nétrine-1 pouvait également être impliqué dans le processus de transformation tumorale chez l'Homme. Les résultats obtenus sont effectivement en faveur d'anomalies du profil d'expression de ces gènes dans certains sous-types de lymphomes, et notamment dans les LDGC-B et les LCM.

En effet, l'analyse d'une cohorte de LDGC-B a permis de mettre en évidence une modification du ratio DCC/nétrine-1 avec deux modalités différentes selon les deux sous-types de LDGC-B. Ainsi, l'expression de DCC est diminuée 5.8 fois dans le sous-type GC, (par rapport aux amygdales utilisées comme tissus contrôle), alors qu'il ne varie pas dans le sous-type ABC. La nétrine-1 en revanche ne varie pas dans le sous-type GC mais voit son expression augmentée 4.2 fois dans le sous-type ABC. Une analyse par immunohistochimie (IHC) confirme que la nétrine-1 est fortement exprimée dans 71.4% des cas de LDGC-B.

La même analyse a été réalisée dans une cohorte de biopsies de lymphomes B du manteau dans laquelle une diminution de 9.5 fois de l'expression de DCC et une forte augmentation de 14 fois de l'expression de la nétrine-1 ont été observées. Comme pour les LDGC-B, l'IHC a permis de confirmer ce résultat avec un niveau de nétrine-1 haut dans 55.6% des cas de MCL. Il est intéressant de noter que les lignées cellulaires de LDGC-B de type GC ont un taux d'expression bas voire inexistant pour le récepteur, alors que les lignées de type ABC expriment le récepteur et son ligand, confirmant les résultats obtenus dans la cohorte de patients. Nous avons voulu déterminer l'origine possible du gain de nétrine-1. La voie NFkB a été décrite comme étant activée de façon anormale dans les LDGC-B de type ABC. Or, l'équipe du Dr Patrick Mehlen a montré que l'expression de la nétrine-1 peut être modulée par NFkB dans les cancers colorectaux liés à l'inflammation. Nous avons testé le rôle de NFkB sur l'expression anormale de la nétrine-1 dans les LDGC-B de type ABC. L'utilisation d'un inhibiteur de la voie NFkB induit effectivement une diminution de l'expression de la nétrine-1 sur la lignée OCI-Ly3 de type ABC, suggérant que l'activation de cette voie de signalisation puisse être à l'origine des anomalies d'expression de ce ligand. Selon la théorie des RD, une perte de DCC et/ou un gain de nétrine-1 favoriseraient la survie des cellules tumorales en inhibant la capacité de DCC à induire l'apoptose. Nous avons donc voulu vérifier cette hypothèse *in vitro* dans des lignées cellulaires de LDGC-B et de LCM.

L'invalidation de la nétrine-1 à l'aide d'un siARN dans une lignée de LCM, les Granta-519, induit l'apoptose dans cette lignée. L'invalidation conjointe de la nétrine-1 et de DCC dans cette lignée abolit en revanche l'apoptose déclenchée par le retrait du ligand. Inversement, restaurer l'expression de DCC par surexpression dans la lignée SUDHL4 de LDGC-B de type GC diminue la densité cellulaire. La nétrine-1 se comporte donc comme un facteur de survie, en bloquant la mort induite par DCC.

Dans une perspective de développement de nouvelles thérapies, nous avons finalement testé l'impact du blocage de l'interaction nétrine-1/DCC à l'aide d'un anticorps interférant, dans le but de restaurer l'apoptose induite par DCC. Le traitement des lignées cellulaires Granta-519 et OCI-Ly3, positives à la fois pour le récepteur et le ligand, à l'aide de cet anticorps ont permis de confirmer les observations précédentes et mis en évidence que l'utilisation d'un anticorps interférant induit une diminution de la densité cellulaire. Cette diminution est associée à une augmentation de l'apoptose dans ces lignées, comme nous l'avons montré par un test TUNEL et confirmé par un test d'activation de la caspase 3. L'effet de l'anticorps interférant est bloqué lorsque l'expression du récepteur est invalidée par siARN. La lignée OCI-Ly7 n'exprimant ni DCC ni la nétrine-1 a été utilisée comme contrôle afin de démontrer la spécificité de l'anticorps interférant. Le traitement de cette lignée par l'anticorps n'induit pas d'apoptose, confirmant le mode d'action du composé testé. Et enfin, nous avons pu montrer dans un modèle de xénogreffes de chacune des deux lignées Granta-519 et OCI-Ly3 en souris immunodéficientes que l'utilisation de cet anticorps permet de ralentir la croissance tumorale.

Le couple nétrine-1/DCC semble donc être impliqué dans la tumorigenèse des LDGB-B et des LCM et l'utilisation d'un anticorps interférant dans la liaison récepteur/ligand pourrait être envisagée comme une piste thérapeutique prometteuse chez les patients présentant une expression de la nétrine-1 et de son récepteur DCC.

5.2. Rôle du couple DCC/nétrine-1 dans les lymphomes extra-nodaux

5.2.1. Objectifs et hypothèses

Les lymphomes extra-nodaux sont des lymphomes se distinguant par une localisation particulière, mais analogues aux LDGC-B sur le plan histologique. Compte-tenu de leur agressivité, de l'absence d'étiologie moléculaire connue et de la nécessité de développer de nouveaux traitements, nous avons cherché à définir le rôle du couple DCC/nétrine-1 dans la survenue de ces cancers.

5.2.2. Matériel et méthodes

Echantillons de patients

Cohorte numéro 1 : L'expression de la nétrine-1 a été testée par IHC sur une série de 50 tumeurs primaires non traitées de LNH et relues par un expert anatomopathologiste. L'âge médian était de 64 ans (gamme 40-91) (Dr C. Chassagne-Clément).

Cohorte numéro 2 : 10 échantillons de PCNSL ont été analysés par le Dr Patrick Harter à l'Institut Edinger (Francfort).

Construction de la TMA et immunohistochimie

Les tumeurs ont été incluses en paraffine et des zones représentatives des tumeurs ont été sélectionnées par l'anatomopathologiste. Des triplicats de chaque tumeur ont été insérés dans un bloc TMA contenant 25 tumeurs au total. Des tissus normaux (amygdales, ganglions réactionnels, muscle et foie) ont été ajoutés comme contrôle négatif pour construire la TMA. 2 TMA ont été utilisées.

Pour l'immunodétection de nétrine-1 dans les tissus humains, des sections de 4 μM d'épaisseur ont été réalisées sur les blocs. Le déparaffinage, la réhydratation et le démasquage d'épitopes ont été réalisés grâce au PT Link (Dako). Les sections sont ensuite incubées à température ambiante pendant 1 heure avec un anticorps polyclonal anti-nétrine-1 (1/50, R&D Systems). La détection est réalisée à l'aide du kit EnVision FLEX (Dako) et la réaction visualisée par du DAB (diaminobenzidine). Les noyaux sont colorés à l'hématoxyline.

Lignée cellulaire

La lignée murine 38C13 est maintenue en culture dans du milieu DMEM contenant 10% de sérum de veau fœtal et du bêta-mercaptoéthanol à 50 μM + 1% de pénicilline/stréptomycine.

Mesure de l'activité caspase 3

A J-0, les cellules sont mises en culture dans une plaque 6 puits (100.000 cellules par puits). A J-1, le milieu de culture est remplacé par le même milieu contenant seulement 1% de sérum afin d'induire un stress ou du milieu contenant 1% de sérum et de la nétrine-1 recombinante à 150 ng/mL. A J-2, les cellules sont récoltées et l'activation de la caspase 3 mesurée à l'aide du Kit Caspase 3/ CPP32 Fluorimetric Assay (Gentaur Biovision).

RT-PCR quantitative

L'ARNm total est extrait des cellules/tissus à l'aide du kit Nucleospin RNAII (Macherey-Nagel). 1 μg d'ARNm est utilisé pour faire une transcription inverse par le kit iScript cDNA synthesis de Biorad. La RT-PCR quantitative est ensuite réalisée sur l'appareil LightCycler 2.0 (Roche) à l'aide du kit Light Cyclyer FastStart DNA Master SYBERGreen I de Roche.

Lignées murines et greffes de cellules tumorales

Les souris sont hébergées par la plateforme Anican selon les conditions de bien-être préconisées par le comité d'éthique animale. Nous disposons ainsi ([Figure 11](#)) :

- D'une lignée présentant une surexpression conditionnelle de nétrine-1 (nétrine-1 PLUS). L'expression du transgène nétrine-1 cloné sous contrôle du promoteur rosa constitutif dépend dans ce modèle, de l'excision par la recombinaison Cre, de 2 sites LoxP entourant un stop transcriptionnel. Afin d'induire une surexpression de nétrine-1 dans tous les organes, les animaux nétrine-1 PLUS ont été croisés avec une lignée E2A-Cre, exprimant la Cre de manière ubiquitaire.
- D'une lignée présentant une invalidation conditionnelle de la nétrine-1 (nétrine-1 KO). L'invalidation constitutive de la nétrine-1 est létale avant la naissance. Les

Partie 1 : Implication du couple nétrine-1/DCC dans la survenue de lymphomes à cellules B

souris nétrine-1 KO, présentent une invalidation conditionnelle de la nétrine-1, dépendant de l'excision de sites Lox encadrant l'exon 3. Elles ont été croisées avec une lignée Rosa-Cre-ERT2 puis injectées au tamoxifène à J-35 pour induire la recombinaison.

L'ADN est extrait de fragments tissulaires par de la soude à 50mM pendant 1 h à 95°C. Les amorces utilisées pour la PCR sont les suivantes :

Pour les souris nétrine-1 PLUS :

Rosa26-hNTN1 Wtfwd	TCC CAA AGT CGC TCT GAG TT
Rosa26-hNTN1 WT rev	CCT CCA TTT TCC TAT TTG CCC
Rosa26-hNTN1 Tg fwd	ACT GGT GGA AGT TCA CGG TG
Rosa26-hNTN1 Tg rev	CAC CTT CCA GGG TCA AGG AA

Pour les souris nétrine-1 KO :

Ntn1 KO Fw	CACCTCTGAACTCTGGCTG
Ntn1 KO Rv	GGATACAGTAATCTGGGCTC

Pour la greffe de cellules en intraveineuse caudale, un test pilote a d'abord été réalisé sur des souris femelles C57BL-6 âgées de 6 semaines afin de déterminer la quantité optimale de cellules de la lignée 38C13 à greffer. Les cellules 38C13 (1000, 5000, 50 000 et 100 000 cellules) sont resuspendues dans 100 µL de PBS stériles puis injectées par voie intraveineuse dans la queue des souris. Les souris sont pesées de façon hebdomadaire et observées afin de détecter le moindre signe de souffrance (perte de poids, prostration...).

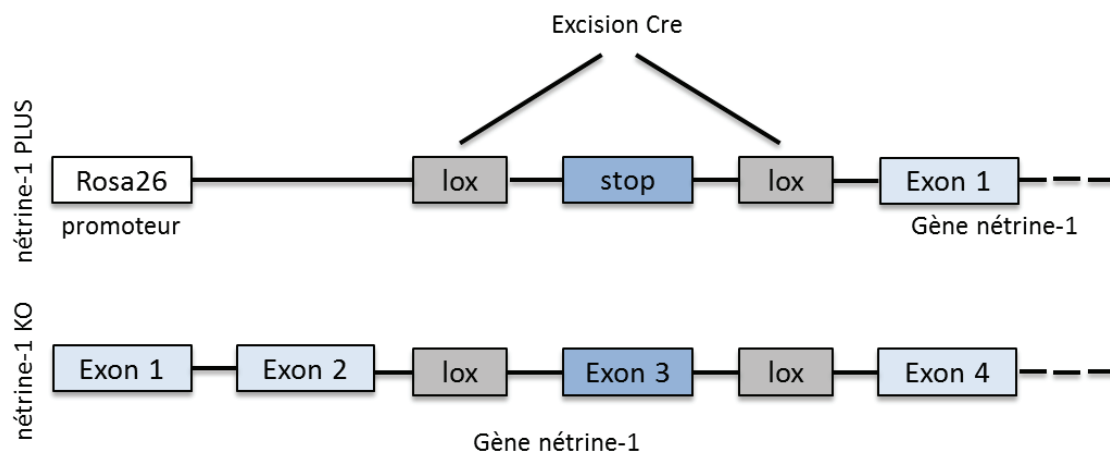


Figure 11: Schéma des constructions murines nétrine-1 PLUS et nétrine-1 KO (Figure originale). Après croisement avec une lignée exprimant la recombinaise Cre, les souris nétrine-PLUS surexpriment la nétrine-1 de façon ubiquitaire sous le contrôle du promoteur Rosa26 alors que les souris nétrine-1 KO sont invalidées par excision de l'exon 3.

- a) Analyse du patron d'expression du couple DCC/nétrine-1 dans les lymphomes extra-nodaux

Résultats obtenus

L'analyse des cohortes utilisées dans la partie précédente a permis de montrer que la dérégulation du couple DCC/nétrine-1 dans les lymphomes diffus à grandes cellules B et les lymphomes du manteau favorise la tumorigenèse de ce type de cancers. A l'aide d'un Tumor MicroArray (TMA), nous avons analysé l'expression du couple DCC/nétrine-1 dans d'autres types de lymphomes B (folliculaires, LCM, LDGC-B, extra-nodaux). Une analyse stratifiée en fonction du niveau d'expression de nétrine-1 dans les lymphomes de cette TMA a été réalisée. Il ressort de cette stratification que les lymphomes extra-ganglionnaires à savoir sein, parotide, os, muscle, tissus mous, peuvent être mis en opposition avec les lymphomes à localisation moelle/rate sur la base du niveau d'expression de la nétrine-1. En effet, la classification de l'intensité d'expression de la nétrine-1 des cas analysés a été réalisée en aveugle par les anatomopathologistes du Centre Léon Bérard selon une échelle de 0 à 3, où 0 représente une absence de nétrine-1 et les échelons 1,2 et 3 une intensité croissante de nétrine-1. Or, les lymphomes à localisation extra-nodale présentent une intensité d'expression de 0 à 1, soit une nétrine-1 très significativement sous-exprimée alors que les lymphomes à localisation ganglionnaire ont une intensité de nétrine-1 d'un niveau 2 ou 3. Le profil d'expression de la nétrine-1 semble donc particulier dans les lymphomes extra-nodaux puisqu'elle semble beaucoup plus faible que celle des lymphomes ganglionnaires ([Figure 12](#)).

			Intensité de marquage nétrine-1 scorée à 2 ou 3		Total
			0	1	
Lymphomes Extra Nodaux non hématologiques	0	Effectif	24	16	40
		% relatif à la catégorie de lymphomes	60.0% (=24/40)	40.0% (=16/40)	100.0%
		% relatif au score d'expression de la nétrine-1	70.6% (=24/34)	100.0% (=16/16)	80.0% (=40/50)
		% du total	48.0% (=24/50)	32.0% (=16/50)	80.0% (=40/50)
	1	Effectif	10	0	10
		% relatif à la catégorie de lymphomes	100.0% (=10/10)	0% (=0/10)	100.0%
		% relatif au score d'expression de la nétrine-1	29.4% (=10/34)	0% (=0/34)	20.0% (=10/50)
		% du total	20.0% (=10/50)	0% (=0/50)	20.0% (=10/50)

Figure 12 : Expression de la nétrine-1 dans les lymphomes extra-nodaux à localisation non hématologique. Les lymphomes ont été subdivisés en 2 groupes sous forme de variable catégorielle, en fonction de leur localisation extra-nodale et non hématologique (1) ou non (0). Dans chacun des groupes, les échantillons testés ont été répartis en 2 catégories : existence d'un marquage nétrine-1 scoré à 2 ou 3 (1) ou inférieur (0). 100% des lymphomes extra-nodaux non hématologiques ont un score de marquage nétrine-1 inférieur à 2, contre seulement 60% des autres lymphomes. Ils représentent donc 29.4% des lymphomes non marqués, mais seulement 20% de l'effectif total. Réciproquement, 100% des lymphomes marqués ne sont pas de type extra-nodal à localisation non hématologique, alors qu'ils représentent 32% de l'effectif total. $p=0.02$, test bilatéral exact de Fischer.

De manière intéressante, une étude en IHC de différents cas issus de biopsies stéréotaxiques de PCNSL, réalisée en collaboration avec le Dr Patrick Harter (Institut Edinger, Francfort) montre une forte expression du récepteur DCC dans la tumeur alors que l'expression de son ligand nétrine-1 est restreinte et localisée à la périphérie, particulièrement dans la couronne comprenant des astrocytes réactionnels (Figure 13). Ces cas de lymphomes présentent également une infiltration de lymphocytes B normaux et cette infiltration lymphocytaire non-néoplasique exprime très peu DCC contrairement à la tumeur. Enfin, une analyse *in silico* de données issues d'une base de données publique a permis de mettre en évidence seulement 6 mutations du gène DCC sur 798 cas analysés. Ces résultats suggèrent que les cellules de PCNSL conservent majoritairement l'expression de DCC sous forme fonctionnelle, avec une expression de la nétrine-1 par le microenvironnement.

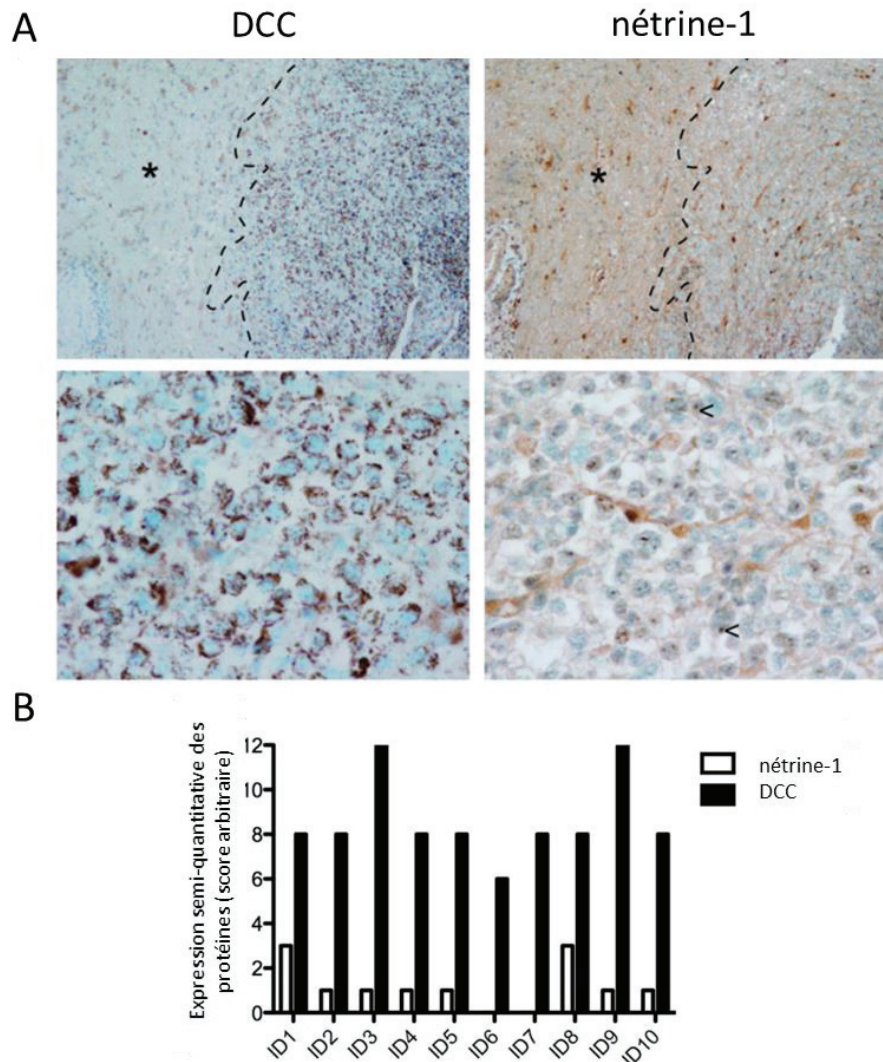


Figure 13 : Expression du couple DCC/nétrine-1 dans différents cas de PCNSL. (A) Exemple de marquage en IHC de DCC et de la nétrine-1 dans une coupe de PCNSL. La partie saine est indiquée par une astérisque. (B) Quantification de l'expression du couple DCC/nétrine-1 dans 10 cas de PCNSL.

Travaux en cours

De nouveaux cas de lymphomes extra-nodaux ont été désarchivés en collaboration avec le service d'anatomopathologie du Centre Léon Bérard. 4 types de lymphomes extra-nodaux ont été inclus (sein, testicules, peau et PCNSL). Un marquage sera, comme précédemment, réalisé sur ces échantillons afin de définir le niveau d'expression de la nétrine-1 d'une part et de DCC d'autre part. En collaboration avec le service d'anatomopathologie, nous évaluerons ensuite l'intensité des marquages et conférerons un score à chaque échantillon, en aveugle. Une analyse statistique sera ensuite réalisée sur la base de ces résultats, afin de comparer le niveau d'expression de la nétrine-1 et de DCC, dans les lymphomes extra-nodaux par rapport aux lymphomes nodaux. Comme le montre la [Figure 14](#), le marquage obtenu pour un cas de lymphome testiculaire révèle une

Partie 1 : Implication du couple nétrine-1/DCC dans la survenue de lymphomes à cellules B

expression importante de DCC, restreinte au LDGC-B. Nous souhaitons également réaliser une RT-qPCR sur des copeaux de paraffine pour quelques échantillons de lymphomes extra-nodaux, afin de vérifier l'expression du couple DCC/nétrine-1 par une autre technique et nous assurer ainsi de la spécificité des IHC.

En parallèle, le Dr P. Harter (Edinger Institute, Francfort) réalise un marquage immunohistochimique systématique de tout nouveau cas de PCNSL pris en charge dans son institut.

Nous avons donc montré ici que le profil d'expression du couple nétrine-1/DCC semble être particulier dans les lymphomes extra-nodaux avec une expression du récepteur par les cellules tumorales et une expression du ligand restreinte à l'environnement tumorale. Nous avons donc émis l'hypothèse que la nétrine-1 exprimée par le stroma dans certains tissus pourrait être un facteur expliquant le tropisme particulier des lymphomes extra-nodaux et notamment celui des lymphomes extra-nodaux et notamment des PCNSL, en favorisant la survie des cellules B tumorales exprimant DCC.

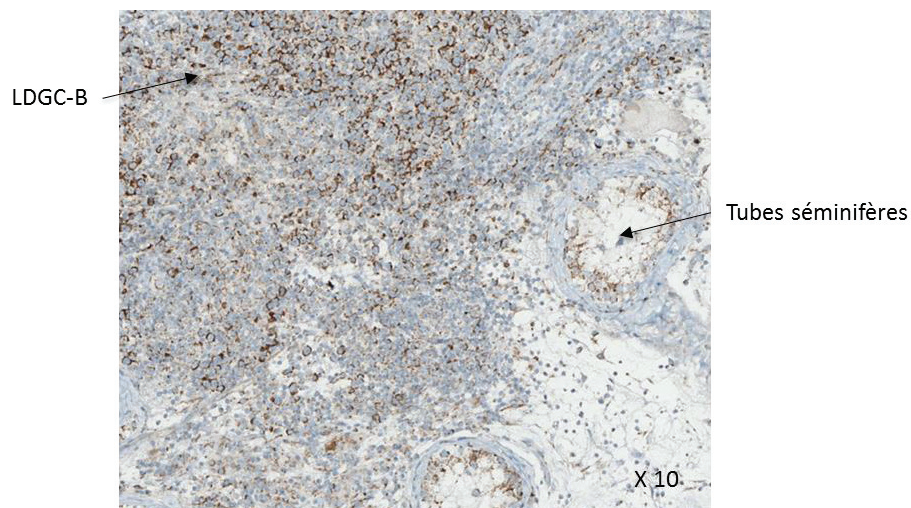


Figure 14 : Immunohistochimie de DCC réalisée sur coupe de lymphome testiculaire. Le marquage est intense dans la tumeur (LDGC-B) et très faible voire inexistant au niveau des tubes séminifères.

b) Rôle du couple nétrine-1/DCC dans la survie et le tropisme des lymphomes extra-nodaux

b-1) Objectifs et stratégie du projet

Nous souhaitons déterminer le rôle potentiel de facteur trophique de la nétrine-1 pour les lymphomes extra-nodaux. Nous avons choisi de tester cette hypothèse en développant différents modèles murins de greffes syngéniques pour tester le rôle du couple DCC/nétrine-1 dans la survenue des lymphomes extra-nodaux. Dans un premier temps,

nous avons sélectionné la lignée murine 38C13, lignée de lymphome diffus à grandes cellules B développée après induction par l'agent carcinogène DMBA chez la souris (Bergman et Haimovich 1977), dont la greffe par voie intra-veineuse a déjà été décrite afin de tester l'efficacité de la vaccination à l'aide d'Ig anti-tumorales sur les lymphomes (Timmerman et al. 2001). Notre objectif était :

- Tout d'abord, de tester la dépendance de cette lignée à la nétrine-1 *in vitro* ;
- Puis, de greffer ces cellules tumorales par voie intra-veineuse dans des souris présentant soit une surexpression de nétrine-1, soit une invalidation conditionnelle de ce gène. L'idée était alors de déterminer l'impact du niveau d'expression de la nétrine-1 sur l'incidence, la localisation et l'agressivité des lymphomes extra-nodaux.

Trois groupes de souris présentant différents niveaux d'expression de la nétrine-1 ont été utilisés :

- des souris contrôles, avec un niveau physiologique de nétrine-1 ;
- des souris surexprimant la nétrine-1 (nétrine-1 PLUS) ;
- des souris invalidées pour la nétrine-1 (nétrine-1 KO) ;

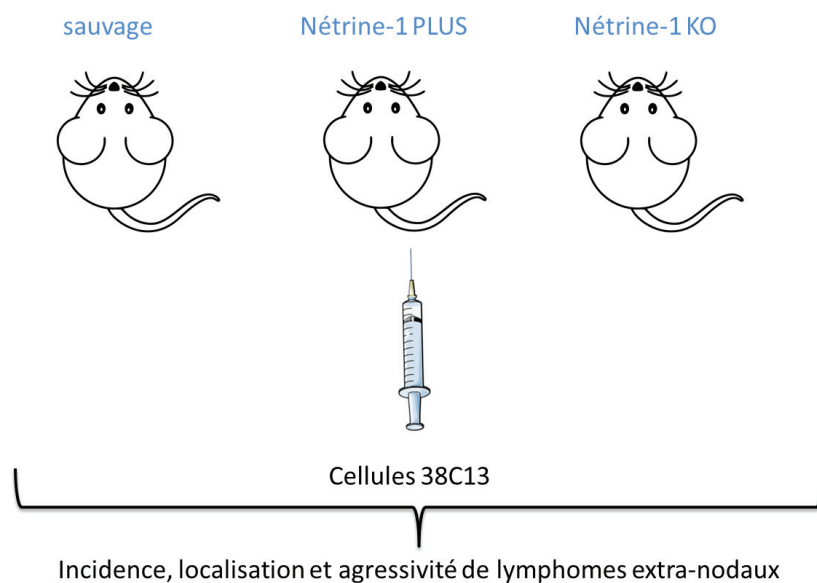


Figure 15 : Résumé graphique de l'expérience de greffe syngénique. Les cellules murines 38C13 sont greffées par voie intraveineuse dans des souris soit contrôles, soit surexprimant la nétrine-1 (nétrine-1 PLUS) soit invalidée pour la nétrine-1 (nétrine-1 KO).

b-2) Résultats obtenus

Analyse de l'expression du couple DCC/nétrine-1 dans la lignée murine 38C13

L'expression du couple DCC/nétrine-1 dans les 38C13 a été comparée à celle de la lignée murine 4T1 de carcinome mammaire, connue pour exprimer le récepteur DCC et le ligand nétrine-1 en grande quantité. L'ARNm a été extrait sur des cellules en croissance. Nous avons montré que cette lignée exprime DCC à un niveau un peu plus élevé que les 4T1

alors que l'expression de la nétrine-1 dans les 38C13 est très faible voire inexistante par rapport à celle présente dans les 4T1 (Figure 16). Ce résultat est conforme à notre hypothèse selon laquelle les lymphomes extra-nodaux expriment le récepteur DCC et nécessite une expression du ligand nétrine-1 par l'environnement.

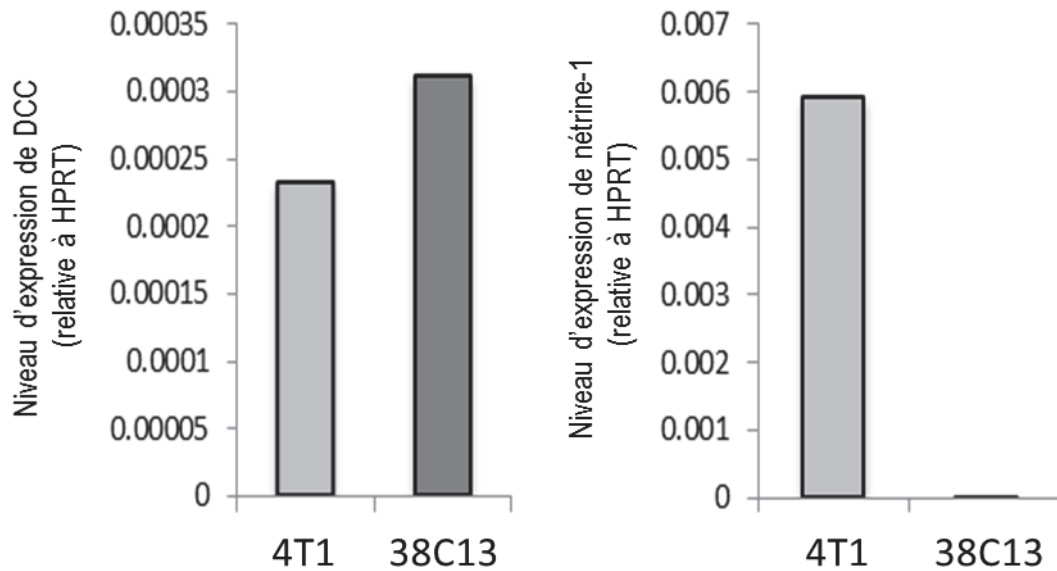


Figure 16 : Analyse de l'expression de DCC et de la nétrine-1 dans la lignée murine 38C13. La lignée murine de carcinome mammaire 4T1 est utilisée comme contrôle du niveau d'expression de DCC et de la nétrine-1. La quantification de l'expression des gènes a été réalisée par RT-qPCR et normalisée par le gène de ménage HPRT.

Effet de la nétrine-1 sur la survie de la lignée murine 38C13

Afin d'étudier le rôle de facteur de survie potentiel de la nétrine-1 sur la lignée 38C13, nous avons mesuré le niveau d'activation de la caspase 3, effecteur de la signalisation apoptotique dans différentes conditions (Figure 17). En condition de stress induite par déprivation en sérum du milieu, la caspase 3 est fortement activée dans la lignée 38C13, passant d'une valeur de 1.8 en présence de 10% de sérum de veau fœtal à 6.2 en condition stressante à 1% de SVF. En revanche, une diminution de l'activation de la caspase 3 d'un facteur 1.5 est observée lorsque la nétrine-1 est ajoutée dans le milieu. Cette lignée cellulaire dépend donc de la présence de la nétrine-1 dans le milieu extra-cellulaire pour sa survie en condition de stress.

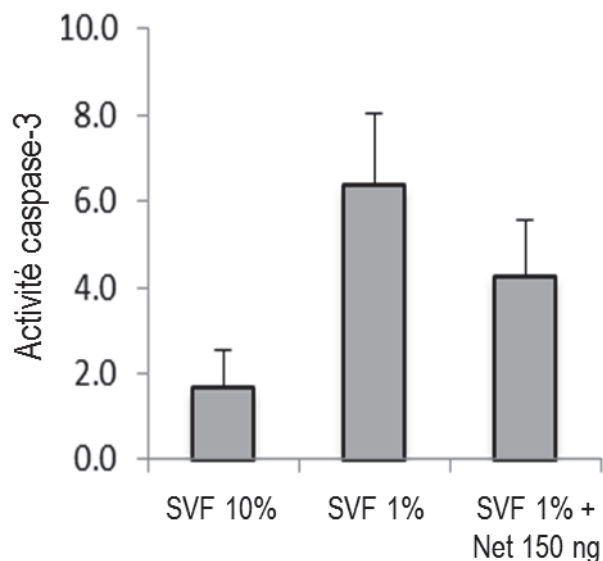


Figure 17 : Impact de la nétrine -1 sur la survie des cellules 38C13. Activité caspase 3 mesurée dans la lignée 38C13 en condition normale (SVF 10%), en condition de stress (SVF 1%) ou en condition de stress en présence de nétrine-1 (SVF 1% + nétrine-1 recombinante 150 ng/mL). Résultats : moyenne +/- écart-type, n=3.

Mise au point d'un modèle murin de xénogreffes syngéniques

Nous avons tout d'abord voulu confirmer les résultats décrits dans une publication sur le développement de lymphomes après injection par voie intraveineuse de la lignée 38C13 murine : l'injection de 500 à 1000 cellules 38C13 dans la circulation sanguine de souris C3H/HeN entraîne dans ce modèle le développement de lymphomes dans les organes lymphoïdes secondaires puis des métastases au foie et aux poumons. La survie médiane des animaux est de 25 à 30 jours avec une mortalité supérieure à 70% (Bryson et al. 1999). Nous avons effectué un test préliminaire en greffant 5 souris de souche C57 Black 6 avec 1000 cellules 38C13 en intraveineuse. Les souris ont été pesées de façon hebdomadaire afin d'observer une éventuelle perte de poids. Au bout de 90 jours, nos souris n'avaient développé aucun signe de souffrance quelconque laissant penser à l'apparition d'une tumeur (cachexie, perte de poids, prostration) et après dissection nous n'avons constaté aucun signe d'un potentiel développement tumoral. Nous avons répété l'expérience en augmentant les quantités de cellules greffées toujours en intraveineuse : 1000, 5000, 100.000 et 500.000 cellules. De la même façon que précédemment, nous n'avons pas observé d'apparition de tumeurs dans aucun des groupes greffés après 90 jours. L'examen anatomopathologique du cerveau et des principaux organes n'a pas révélé l'existence de lésions tumorales. Nous avons également testé ces greffes en I.V dans les souris nétrine-1 PLUS qui surexpriment la nétrine-1 afin de voir si la présence de celle-ci peut favoriser la prise tumorale. Les souris nétrine-1 PLUS ont été greffées après induction de l'expression conditionnelle de nétrine-1 par injection de tamoxifène.

Partie 1 : Implication du couple nétrine-1/DCC dans la survenue de lymphomes à cellules B

Cependant, comme les souris sauvages, les souris nétrine-1 PLUS ne développent pas de tumeurs après injection de cellules 38C13.

PARTIE 2 : Caractérisation fonctionnelle d'ADAMTSL-1, partenaire potentiel de DCC

1. La matrice extracellulaire (MEC)

1.1. Présentation générale

Véritable réseau 3D, enchevêtrement non-cellulaire complexe de molécules formant un ciment englobant les cellules, la MEC ne constitue pas seulement un échafaudage contribuant au soutien et à la structuration physique et mécanique des tissus, mais possède également un vrai rôle fonctionnel dans des processus tels que le développement embryonnaire ou l'homéostasie.

On peut distinguer deux types de MEC :

- la matrice péricellulaire, telle que la membrane basale, qui a une structure très compacte et peu poreuse permettant l'ancrage des cellules épithéliales. Cet ancrage permet de donner aux cellules une orientation et une polarité apico-basale nécessaire à la différenciation cellulaire.
- La matrice interstitielle, chargée et fortement hydratée confère quant à elle une certaine tension aux tissus, mais agit également comme un amortisseur diminuant l'impact des pressions extérieures subies par les cellules (Cox et Erler 2011).

Loin d'être une structure inerte, la MEC connaît au niveau microscopique un remodelage dynamique constant permettant une adaptation aux modifications de l'organisme notamment dans le cadre du développement, mais également de processus physiologiques tels que la cicatrisation. La quantité et la composition de la MEC sont conditionnées par des phases de sécrétion, de modifications qualitatives et de dégradation enzymatique par des protéases spécifiques régulées finement. Ces protéases de la matrice, métalloprotéases de la famille des MMP ou des ADAMs, sont elles-mêmes régulées par des inhibiteurs, les TIMPs (Tissue Inhibitor of Metalloproteinase). Malgré le contrôle complexe des facteurs de remodelage, des défauts de matrice sont observés dans différentes maladies. Par exemple, des dépôts excessifs de collagène ont été observés dans les pathologies de type fibrose ou cancer. On retrouve également dans les cancers une surexpression des protéoglycanes à héparane sulfates, favorisant la signalisation des facteurs de croissance (Lu, Weaver, et Werb 2012). Dans le cas de la fibrose pulmonaire, on observe une surexpression des TIMPs, conduisant à un dépôt pathologique de protéines de la MEC (Cox et Erler 2011).

1.2. Composition et rôles de la MEC

1.2.1. Composition

La MEC est composée de deux familles principales de macromolécules (Figure 18) :

- les protéoglycanes (PG), qui sont les molécules occupant la majorité de l'espace matriciel ;
- les protéines fibreuses, telles que les différents types de collagènes, l'élastine et la fibronectine. Cet ensemble modulable de macromolécules forment un échafaudage dans lequel peuvent s'enchâsser les cellules.

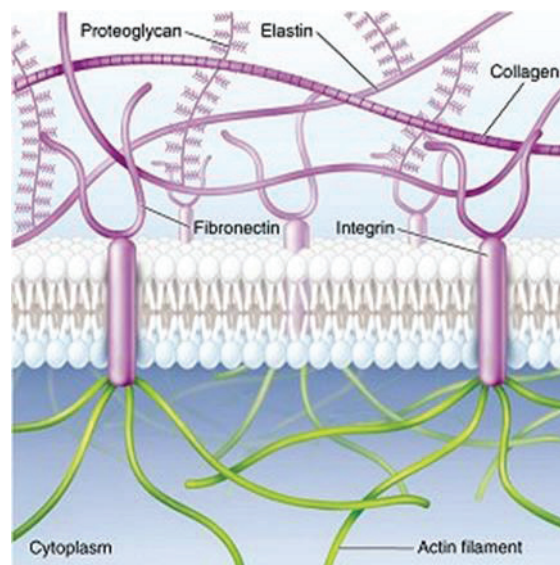


Figure 18 : Schéma de l'assemblage des macromolécules matricielles. Les macromolécules fibreuses s'assemblent en réseau sur lequel viennent s'associer les protéoglycanes. Les molécules de la MEC sont reliées au cytoplasme et au cytosquelette par l'intermédiaire des intégrines.

a) Les protéoglycanes (PG)

A l'exception de l'acide hyaluronique, les protéoglycanes, combinent une protéine centrale à laquelle peut se greffer une ou plusieurs chaînes de glycosaminoglycanes (GAG), formant une mosaïque glucidique à forte capacité de rétention d'eau et multiples charges négatives. Les GAG sont des polysaccharides linéaires pouvant appartenir à deux sous-types : les GAG sulfatés comme les chondroïtine sulfate (CS), dermatane sulfate (DS) ou encore keratane sulfate (KS) et les GAG non sulfatés comme l'acide hyaluronique (HA). Ils confèrent ainsi à la MEC une structure gélifiée pouvant être plus ou moins hydratée en fonction de la nature du tissu et des besoins physiologiques comme la résistance aux forces mécaniques et l'élasticité pour le cartilage, ou encore la fonction de filtration du rein (Frantz, Stewart, et Weaver 2010). Les protéoglycanes de la MEC communiquent

constamment avec les cellules, par interaction avec différentes molécules de signalisation : facteurs de croissance, cytokines, récepteurs membranaires ou autres protéines de la MEC. Les protéines decorine, biglycane et fibromoduline par exemple, peuvent interagir avec le TGF β et ainsi participer à sa séquestration ou à son inactivation en se liant directement avec. Le PG hyaluronane peut quant à lui jouer le rôle de molécule de signalisation par sa capacité de liaison à différents récepteurs cellulaires comme le CD44 ou le récepteur HARE (HA receptor for endocytosis), déclenchant ainsi des voies de signalisation MAPK ou encore PI3K/Akt (Schaefer et Schaefer 2009).

Ces interactions se font la plupart du temps par l'intermédiaire des chaînes de GAG.

On distingue deux familles majeures de protéoglycanes extracellulaires : la famille des hyalectanes (aussi appelées famille des lecticanes) et la famille des petits protéoglycanes riches en leucine (PPRL) ou Small Leucine-rich Proteoglycans.

a-1) Les hyalectanes

Les protéines du sous-groupe des hyalectanes (pour Hyaluronic Acid and Lectin binding protein) sont au nombre de 4 : le versicane ubiquitaire, l'aggrecane spécifique du cartilage, et les neurocane et brevicane exprimés exclusivement par le cerveau. Leur particularité commune est d'être composée d'un domaine central auquel se rattachent les chaînes GAG, flanqué d'un domaine N-terminal pouvant lier l'acide hyaluronique et d'un domaine C-terminal auquel peuvent se lier les lectines. Ces deux domaines terminaux sont globulaires (Schaefer et Schaefer 2009).

a-2) Petits protéoglycanes riches en leucine (PPRL)

Les petits protéoglycanes riches en leucine sont caractérisés par la présence de motifs riches en leucine dans leur partie centrale. La famille des PPRL contient 18 membres porteurs ou non de chaînes GAG, divisés en 5 sous-famille : les classes I à III représentent les formes classiques des PPRL alors que les classes IV et V sont considérées comme des formes non-canoniques ne portant aucune chaîne de GAG. Les répétitions de motifs riches en leucine contenues dans la partie centrale sont indispensables aux interactions entre les PPRL et d'autres protéines de la MEC, ce qui fait de ces protéoglycanes des acteurs clés dans différents processus tels que la formation des fibres de collagène (decorine), la régulation de la croissance cellulaire (lumican) ou encore la modulation des Bone Morphogenetic Protein (BMP) (biglycane) (Miguez et al. 2011).

La decorine appartenant à la classe I est le membre le mieux caractérisé des PPRL. Elle contient une chaîne unique de GAG (Dermatane ou chondroïtine sulfate), ainsi que 12 répétitions riches en leucine dans sa protéine centrale. Elle fut à la base décrite et nommée ainsi par sa capacité à s'attacher au collagène et donc à en « décorer » les fibres.

Outre son interaction avec le collagène permettant de réguler la formation et l'alignement des fibres, il a été montré par la suite que la decorine peut séquestrer des facteurs de croissance comme l'EGFR ou l'IGF-IR suggérant ainsi des propriétés anti-tumorigéniques (Neill, Schaefer, et Iozzo 2012).

b) Les protéines fibreuses (collagène, élastine, fibronectine)

Les protéines fibreuses ayant la capacité de former de longs filaments dans la MEC, ont un rôle majoritairement structurel.

Le collagène, protéine majeure représentant 30% des protéines totales du corps humain est également la protéine fibreuse la plus abondante de la MEC interstitielle, synthétisée par les cellules des tissus conjonctifs (fibroblastes, ostéoblastes, chondrocytes). La caractéristique structurale commune à tous les types de collagènes est la présence d'un domaine en triple hélice dû à la répétition du triplet (Gly-X-Y)_n (où X est souvent une proline et Y une hydroxyproline). La MEC interstitielle est majoritairement composée de collagène de type fibrillaire. Les collagènes I, II et III étant majoritaires alors que les collagènes V et XI sont dits minoritaires. Les types II et XI sont plus spécifiques du cartilage. Les fibres de collagène, hétérogènes et de compositions variées, définissent, en fonction de leur composition, les propriétés biomécaniques du tissu.

Une sous-classe de collagène, les Fibril Associated Collagens with Interrupted Triple Helices (FACITs), ayant la capacité de s'associer aux collagènes fibrillaires ont été découverts plus tardivement. Ils présentent, au niveau structural, une interruption de leur triple hélice par des domaines non-collagène, ce qui augmente leur flexibilité. Le collagène de type IX par exemple peut se lier de manière covalente aux fibres de collagène II, ce qui est crucial pour l'intégrité du cartilage.

Les fibres élastiques composant la matrice permettent, quant à elles, d'augmenter la flexibilité et l'adaptabilité des tissus subissant des forces d'étirements répétées comme les vaisseaux sanguins, la peau ou le cartilage. Ces fibres composées majoritairement de polymères d'élastine et de microfibrilles de fibrilline (fibrilline 1, 2 ou 3) sont assemblées pendant le développement, puis très peu, voire pas, renouvelées par la suite.

Les microfibrilles sont localisées en périphérie des fibres, elles permettraient l'alignement des molécules d'élastine. Les molécules de fibrilline contiennent des domaines RGD permettant la liaison aux intégrines et peuvent également se lier aux Heparan Sulfate Proteoglycan (HSPGs), ce qui suggère une communication entre les fibres élastiques et les cellules. D'autres molécules telles que les glycoprotéines associées aux microfibrilles (MAPG) ou la fibuline s'ajoutent en moindre quantité aux fibres élastiques. La fibronectine est une protéine dimérique composée de deux sous-unités de 250 kDa reliées par un pont disulfure. La fibronectine s'assemble en fibres de plusieurs dizaines de micromètres pouvant atteindre des longueurs très importantes et traverser l'embryon entier lors du développement, pendant lequel elle joue un rôle critique. Elle favorise en effet la migration des cellules de la crête neurale ainsi que leur différenciation en cellules du lignage musculaire lisse (Tsang et al. 2009). Ses différents domaines permettent son adhésion aux autres composants de la MEC comme le collagène, mais aussi l'adhésion à la cellule notamment *via* les intégrines. Contrairement aux fibres élastiques, la fibronectine est renouvelée en continu et de façon plus importante à certains moments, notamment lors de la cicatrisation.

1.2.2. Communication MEC-cellules

La MEC n'est pas seulement un échafaudage structurel apportant de la tension et un support aux tissus. Grâce à sa capacité à communiquer avec les cellules par des signaux biochimiques divers, la MEC est loin d'être une structure inerte et elle est indispensable lors de la croissance et de la différenciation, participe à la survie cellulaire et est impliquée dans des phénomènes plus complexes, notamment lors de l'embryogenèse.

Il existe trois mécanismes principaux assurant la signalisation entre la MEC et les cellules alentour :

- En se liant aux récepteurs de la membrane plasmique, les protéines de la MEC permettent ainsi de faire le lien entre celle-ci et le cytosquelette des cellules, mais également de créer un flux d'informations bidirectionnel, entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule. La MEC est reliée à différents récepteurs cellulaires tels que les intégrines, dont la signalisation est augmentée lors de la mise en place des mécanismes de réparation de la peau, ou encore les récepteurs à tyrosine kinase, indispensables lors du développement. Comme mentionné précédemment, la liaison des intégrines aux protéines de la MEC permet également d'induire de la survie cellulaire et de protéger les cellules de l'anoikis.
- La mécanotransduction permet de transformer un stimulus physique, comme une tension ou un relâchement des tissus, en un message chimique transmis à la cellule. Ces forces mécaniques vont permettre notamment l'exposition de sites cryptiques, c'est à dire non accessibles en temps normal, sur les macromolécules de la MEC. Une force contractile peut, par exemple, déplier partiellement la molécule de fibronectine et ainsi augmenter les interactions fibronectine/fibronectine afin de former un réseau favorisant la différenciation cellulaire.
- La protéolyse des composants de la MEC, induite par les différentes protéases de la matrice que nous décrirons plus tard, permet une conversion des molécules structurelles en molécules de signalisation par relargage de petits peptides actifs ou de facteurs de croissance stockés dans la matrice, comme le TGF β ou le facteur de croissance analogue à l'insuline (IGF). La protéolyse de la matrice est un phénomène indispensable au cours du développement des organes branchés, notamment grâce à l'action des MMP qui dégradent la matrice localisée à l'extrémité des bourgeons. Le clivage de la laminine par exemple, pendant l'involution de la glande mammaire permet de relâcher un fragment se liant à l'EGFR et d'augmenter ainsi la migration cellulaire.

1.2.3. Particularités de la MEC du muscle et du cartilage

a) La MEC du muscle squelettique

Les fibres musculaires sont des cellules allongées et plurinucléées, délimitées par une membrane, le sarcolemme. La formation d'une fibre musculaire débute par la fusion en myotube de plusieurs myoblastes, cellules non différenciées à noyau unique à position centrale. La différenciation en myotube se poursuit par la migration des noyaux en périphérie afin de former une fibre multi-nucléée. A l'intérieur du cytoplasme de chaque fibre, se trouve un dispositif contractile, les myofibrilles, composées de filaments d'actine organisés en sarcomère et de myosine. Les fibres sont ensuite organisées en faisceaux, qui s'associent les uns aux autres pour constituer le muscle squelettique.

La MEC du muscle squelettique est divisée en 3 sous-ensembles (Figure 19) :

- l'endomysium, qui entoure chaque fibre musculaire ;
- le perimysium entourant les faisceaux de fibres ;
- et enfin l'epimysium, qui entoure le muscle dans sa globalité.

Le collagène est la protéine structurelle majeure de la MEC du muscle squelettique et peut représenter jusqu'à 10% de la masse sèche d'un muscle. Le collagène de type I et III sont les types prédominants de la MEC du muscle adulte. Le type I est plutôt majoritaire dans le perimysium alors que le III est plus abondant dans l'endo et l'epimysium. On retrouve également en moindre quantité du collagène de type V, XII et XIV. La lame basale du muscle squelettique est composée majoritairement d'un réseau de collagène de type IV et, en moindre quantité, du collagène de type VI, XV et XVIII. En ce qui concerne les protéoglycanes, la décorine et le biglycane de la famille des PPRL sont parmi les plus abondants de la MEC musculaire. La présence de glycosaminoglycanes chargés négativement comme les héparane sulfates PG, perlecane et agrine permettent la séquestration de facteurs de croissance dans la MEC (Mayne et Sanderson 1985).

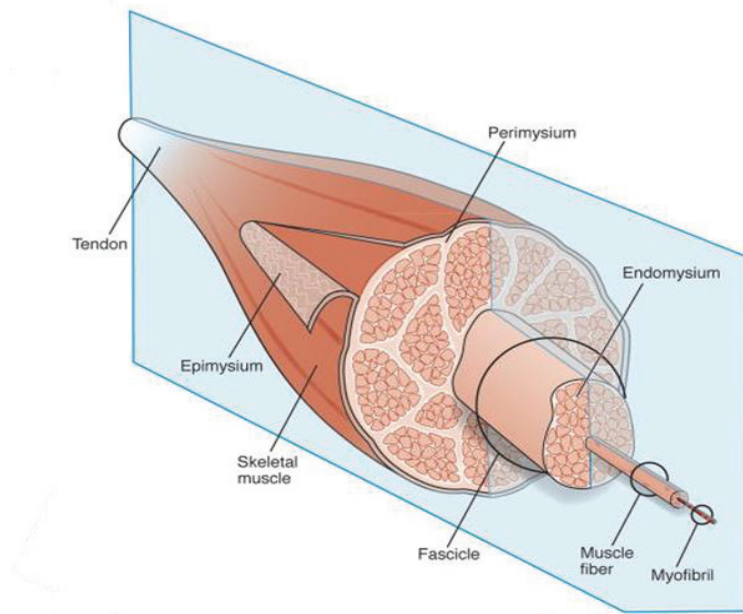


Figure 19 : Schéma de l'organisation d'un muscle squelettique (Gillies et Lieber 2011). Il existe 3 types de MEC dans le muscle : l'endomysium qui entoure chaque fibre musculaire, le périmysium qui entoure les faisceaux de fibre et enfin l'épimysium qui englobe le muscle.

b) La MEC du cartilage

La MEC du cartilage ([Figure 20](#)) joue un rôle crucial dans la régulation de la fonction des chondrocytes, notamment grâce à la signalisation induite par les intégrines. Elle est composée d'un échafaudage constitué majoritairement de collagène II et de protéoglycanes.

Les aggrecanes sont les PG majeurs du cartilage, sécrétés par les chondrocytes. La liaison à l'acide hyaluronique, à la protéine de liaison (Link protein) ainsi que la centaine de GAG de type chondroïtine sulfate pouvant se greffer aux aggrecanes permettent de former une structure gélifiée hautement hydratée. La liaison entre les molécules de la MEC mais également les liaisons entre la MEC et la surface cellulaire permettent aux chondrocytes de recevoir un signal mécano-sensitif de leur environnement, pouvant induire un remodelage de la matrice en fonction des besoins fonctionnels de la cellule (Gao et al. 2014).

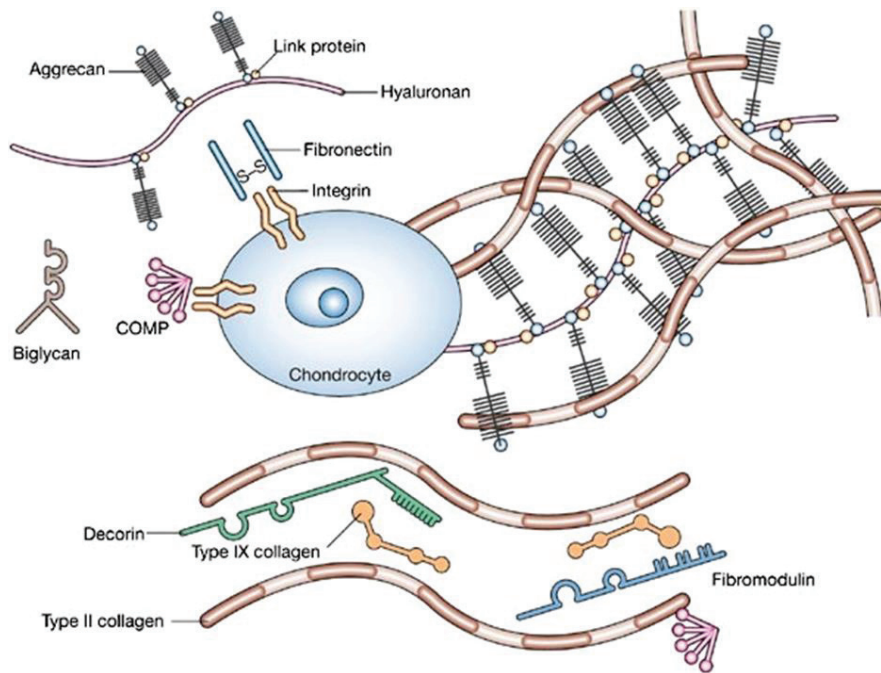


Figure 20 : Schéma de l'organisation de la MEC du cartilage (F. H. Chen, Rousche, et Tuan 2006). La MEC composée majoritairement de collagène de type II et de protéoglycanes de type aggrecanes auxquels sont attachés des GAG de type HA, est synthétisée par les chondrocytes. On retrouve en moindre proportion la décorine et le biglycane.

1.2.4. Les protéases de la MEC : entre structuration et remodelage d'une entité dynamique

a) Présentation générale

Les protéases représentent une large famille d'enzymes catalysant le clivage de protéines en peptides ou en acides aminés par l'hydrolyse de liaisons peptidiques à l'extrémité ou à l'intérieur de la chaîne peptidique. On distingue deux grandes familles de protéases matricielles (Theocharis et al. 2016) :

- Les métalloprotéases, la plus large famille de protéases, nommées ainsi de par la présence d'un site de liaison à un ion métallique dans leur site actif. On retrouve dans cette famille les MMPs, les ADAMs et les ADAMTSs. Elles sont les principales protéases capables de dégrader les composants de la MEC, mais leur activité protéase leur permet également de générer des fragments à activité biologique à partir de macromolécules comme le collagène ou les PGs, ou encore de moduler l'interaction cellule-MEC.
- Les sérines protéases dont le site actif contient un résidu sérine et dont le membre le mieux décrit est la plasmine. Cette protéase permet notamment de dégrader d'autres protéines de la MEC comme la fibronectine, la thrombospondine ou encore la fibrine, ce processus étant indispensable à la coagulation sanguine. La plasmine peut également activer les collagénases de la MEC.

b) Les métalloprotéases de type ADAM

Le premier membre de cette famille décrit dans les années 1990 fut la fertiline (ADAM1 et 2) identifiée chez le cochon d'inde et la souris (Wolfsberg et al. 1995). Cette protéine de la membrane interne est impliquée dans la migration du spermatozoïde dans l'oviducte, l'attachement à la zone pellucide ainsi que la liaison et la fusion spermatozoïde-oocyte. Cette protéine contient un domaine métalloprotéase et un domaine désintégrine. Ces domaines étant alors décrits uniquement comme caractéristiques des protéines de venin de serpents, la famille de protéine contenant la fertiline fut alors nommée « **A Disintegrin And Mettaloprotease** », ADAM, en clin d'œil au personnage biblique, souvent associé au serpent et à la fertilité.

Les protéines ADAM présentent des homologies structurales. Elles appartiennent à la grande catégorie des métalloprotéinases de par la présence d'un ion métallique dans leur site catalytique et plus précisément à la famille des Metzincin, puisqu'elles lient spécifiquement un ion zinc. Les protéines ADAMs contiennent ensuite un domaine riche en cystéine et pour la plupart, un domaine EGF-like.

Du côté N-terminal se situent le pro-domaine, clivé soit par une enzyme extérieure soit par autoclivage lors du transit dans le golgi, ainsi que le domaine métalloprotéinase. Les protéines ADAMs sont toutes ancrées à la membrane plasmique grâce à leur domaine transmembranaire. On retrouve chez les ADAMs le domaine disintegrin-like similaire aux désintégrines, famille de petites protéines retrouvées dans le venin de serpent capables de bloquer l'agrégation des plaquettes en se liant aux intégrines. La famille ADAMs contient chez l'Homme 21 membres, dont seulement 13 possèdent un domaine métalloprotéase actif, suggérant l'importance des interactions protéines/protéines pour le fonctionnement de ces ADAMs sans activité enzymatique. Ces protéines sont indispensables à de nombreux processus physiologiques comme la coagulation, la fertilisation ou le développement et sont par conséquent impliquées, en cas de dérégulation, dans divers phénomènes pathologiques tels que les cancers, la maladie d'Alzheimer ou encore l'asthme. Leur expression est parfois spécifique de certains tissus, comme ADAM 2, 7, 18, 20, 21, 29 et 30 dont l'expression est restreinte aux testicules alors qu'ADAM 11, 22 et 23 sont spécifiquement exprimées dans le système nerveux central et périphérique. ADAM-17 est impliquée dans l'inflammation et l'immunité en activant par clivage le pro-TNF- α . ADAM-10 joue quant à elle un rôle dans le développement en clivant Notch et a un effet bénéfique contre la maladie d'Alzheimer en clivant la protéine APP (Amyloid Precursor Protein), libérant ainsi son domaine extracellulaire à effet neuroprotecteur.

c) La famille des ADAMTS

Les ADAMTS ([Figure 21](#)), bien qu'ayant une structure proche des ADAM, sont rassemblées en une famille distincte comprenant 26 membres : 19 ADAMTS et 7 ADAMTSLike (ADAMTSL), tous sur des locus chromosomiques distincts des ADAMs. On retrouve des ADAMTS chez tous les êtres pluricellulaires, sauf chez les végétaux pour lesquels aucun orthologue n'est connu à ce jour. Les membres de la famille des ADAMTS peuvent être divisés en fonction de leurs substrats (Kelwick et al. 2015) :

- les protéoglycanases (ADAMTS 1, 4, 5, 8, 9, 15 et 20) ;
- les collagénases (ADAMTS 2, 3 et 14) ;
- les protéases du Cartilage Oligomeric matrix Protein (COMP) ;
- celle clivant le facteur Von Willebrand (ADAMTS13) ;
- celles de substrats inconnus (6, 10, 16, 17, 18 et 19).

Les ADAMTS ont deux points communs avec les ADAMs :

- ils appartiennent également à la famille de protéases des Metzincin, du fait de la présence d'un atome de zinc entouré de méthionine, servant de site métalloprotéase. Contrairement aux ADAMs, toutes les ADAMTS sont prédites comme étant fonctionnelles sur le plan enzymatique, avec un site actif stable à 4 liaisons disulfures.
- ils contiennent aussi un domaine désintégrine, mais aucune liaison à ces récepteurs cellulaires n'a été décrite jusqu'à présent pour les ADAMTS.

Contrairement aux ADAMs, les ADAMTS sont toutes sécrétées.

La caractéristique majeure des ADAMTS réside dans l'existence de leur domaine ancillaire : en effet, la présence d'au moins une répétition de type thrombospondine (TSR) d'une cinquantaine d'acides aminés est à l'origine de leur dénomination d'ADAM « **TS** ». Le nombre de répétitions de thrombospondine peut varier de 1 pour ADAMTS4 à 14 pour ADAMTS 9 et 20. On retrouve également dans ce domaine ancillaire une région riche en cystéine et un domaine de séparation (Spacer domain) sans cystéine.

La spécificité des ADAMTS vis à vis de leur substrat se fait au niveau de leur domaine ancillaire. D'autres domaines s'ajoutent ensuite à la structure des ADAMTS et permettent de distinguer des sous-groupes :

- Le module GON-1, défini par ses similitudes avec la protéine GON-1 de *C. elegans*, contenant 10 résidus cystéine, est spécifique d'ADAMTS9 et 20 ;
- Les 2 modules CUB pour ADAMTS13, caractérisés par des structures de type immunoglobulines, sont impliqués dans l'interaction protéine-protéine ;
- Le domaine PLAC (protéase & lacunin) caractérisé par la présence de 6 résidus cystéine, est présent chez ADAMTS2, 3, 6, 7, 10, 12, 14, 16, 17, 18 et 19 ;
- Le domaine mucine, identique à la protéine du même nom, que l'on retrouve chez ADAMTS7 et 12.

Sur le plan fonctionnel, les ADAMTS sont des protéines matricielles jouant un rôle dans la structuration et le remodelage de cette entité lors du développement et le renouvellement des tissus.

Au cours du développement par exemple, la famille des ADAMTS assure la dégradation de différents substrats dont le versicane, protéine matricielle, produite en très grande quantité pour permettre la transition vers une matrice de collagène, protéoglycane et élastine. Ce phénomène est requis notamment pour le développement du cœur : les souris invalidées pour ADAMTS5 présentent des défauts cardiaques dus à un manque d'élimination du versicane. De même, ADAMTS5 est impliquée dans la régression des tissus interdigitaux lors de l'embryogenèse par clivage du versicane, et non par induction de l'apoptose. Les souris invalidées pour ADAMTS1 présentent quant à elles des anomalies utérines et sont infertiles. Ce phénotype résulte du fait que l'oocyte ne peut pas être relargué, puisqu'il reste coincé au niveau de l'ovaire dans la matrice trop riche en versicane.

ADAMTS13 clive, elle, un facteur de coagulation, le facteur de von Willebrand. Une mutation d'ADAMTS13 a été mise en cause dans la forme sporadique du purpura thrombotique thrombocytopénique : ADAMTS13 mutée est incapable de cliver le facteur de von Willebrand qui s'accumule et bouche les vaisseaux sanguins.

Certaines ADAMTS sont décrites comme étant des facteurs pro ou anti-angiogéniques. D'après le modèle d'Hanahan et Weinberg, la capacité à détourner et/ou former des vaisseaux sanguins *de novo* est une des caractéristiques requises pour la mise en place d'une tumeur. Il n'est donc pas étonnant que plusieurs ADAMTS aient été décrites comme étant impliquées dans le développement tumoral (Sun et al., 2015). ADAMTS8, par exemple, agit comme inhibiteur de l'angiogenèse en inhibant la vascularisation induite par le FGF (Fibroblast Growth Factor) et le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor). Son expression est diminuée notamment dans les carcinomes du sein, du cerveau et les cancers non à petites cellules du poumon (Choi et al. 2014). A l'inverse, les protéoglycanases ADAMTS4 et ADAMTS5 semblent avoir un effet pro-tumoral en dégradant la MEC et favorisant ainsi le potentiel invasif de certaines tumeurs comme les glioblastomes (Cal et López-Otín 2015).

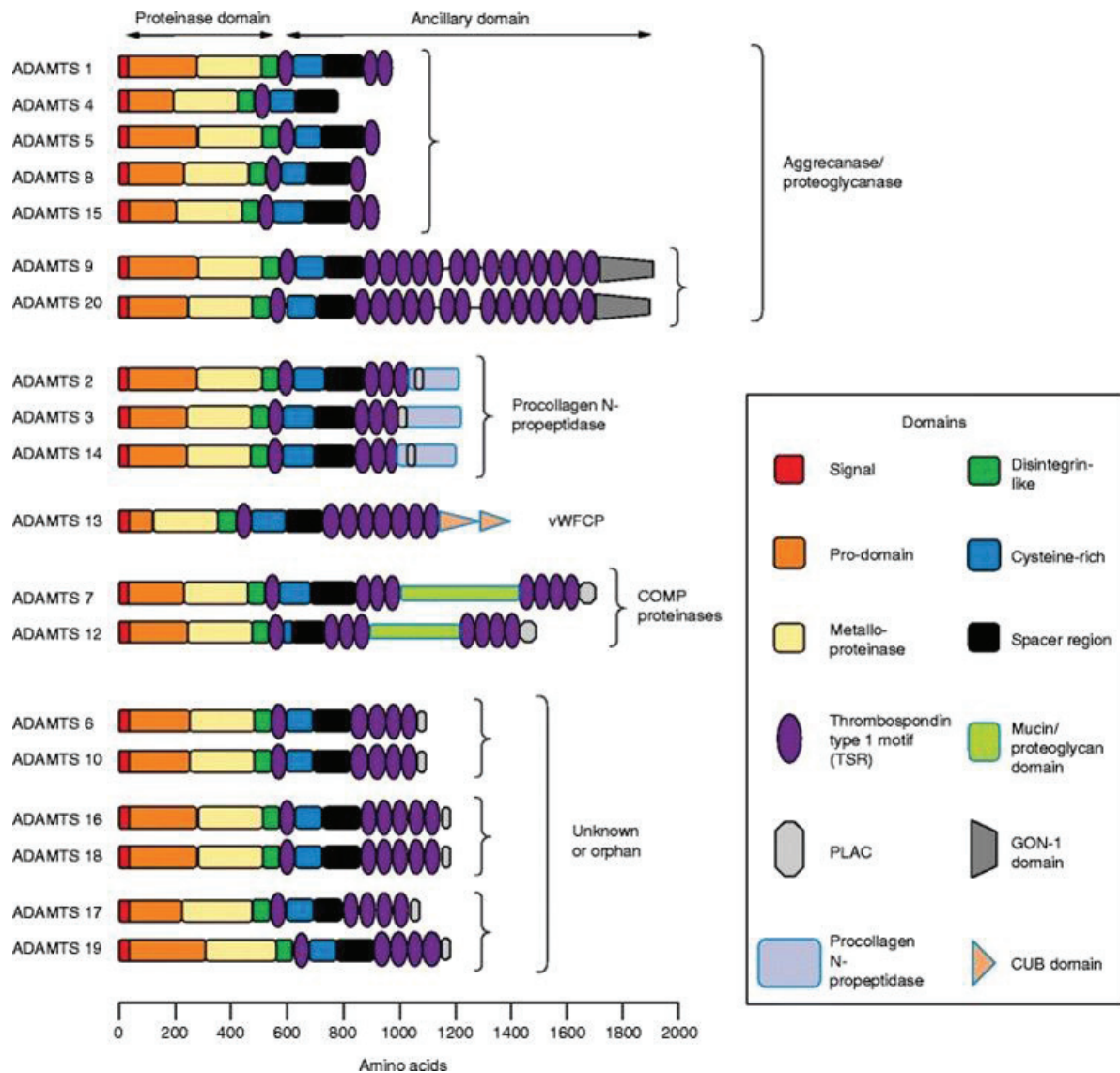


Figure 21 : Organisation structurale des 19 membres de la famille ADAMTS (Kelwick et al. 2015). Du côté N-terminal se trouvent les domaines enzymatiques métalloprotéases et disintégrine-like puis du côté C-terminal le domaine ancillaire. Ce dernier est composé de répétition de type thrombospondine ainsi que de des domaines spécifiques à chaque ADAMTS comme le domaine CUB ou GON-1.

d) Les protéines ADAMTSL : quel rôle pour ces nouvelles venues dépourvues d'activité enzymatique ?

- Présentation et rôle des ADAMTSL dans la MEC

Une nouvelle catégorie de protéines apparentées aux ADAMTS a été identifiée au début des années 2000 avec une particularité, celle de ne pas posséder de domaine enzymatique. En effet, les ADAMTSL ont une partie structurellement très similaire au domaine ancillaire des ADAMTS, mais ne possèdent ni le domaine métalloprotéase, ni le domaine désintégrine-like. Elles ont toutes été décrites comme des protéines sécrétées dans le milieu cellulaire, avec des capacités de liaison à la MEC pour la plupart. Quoique

dépourvues d'activité enzymatique les ADAMTSL semblent jouer un rôle fonctionnel important au niveau de la MEC.

ADAMTSL2 a par exemple été décrite pour son implication dans la dysplasie gélophysique, maladie rare avec moins de 30 ans diagnostiqués en France. La dysplasie gélophysique est caractérisée par une dysplasie squelettique avec des patients présentant une petite taille, un faciès dit « joyeux » et des membres anormaux du notamment à un retard dans l'ossification. Deux gènes ont été décrits comme causaux dans cette maladie : le gène codant pour la fibrilline 1 et celui codant pour ADAMTSL2. Dans les deux cas on observe une désorganisation du réseau fibrillaire, augmentant la biodisponibilité du TGF β (cf paragraphe 3.6) normalement séquestrée par un complexe de protéines matricielles (Le Goff et al. 2008). Il a été démontré qu'ADAMTSL4 interagit avec les microfibrilles de fibrillin-1 et favorise ainsi leur biogenèse. De manière intéressante, il a été montré que des mutations d'ADAMTSL4 sont à l'origine, chez l'Homme et la souris, d'ectopie cristallinienne, autre maladie rare caractérisée par un déplacement du cristallin hors de son logement. Cette maladie est souvent associée aux syndromes de Marfan et de Weill-Marchesani, dans lesquels des mutations de la fibrilline ont été rapportées. Chez des souris dans lesquelles a été introduite une mutation de ADAMTSL4, ce phénotype est associé à une désorganisation des fibres zonulaires, démontrant ainsi la nécessité de la protéine ADAMTSL4 dans l'organisation de ces microfibrilles (Collin et al. 2015).

Le syndrome de Marfan (MFS) est une maladie rare (1/5000, source OrphaNet) touchant le tissu conjonctif. Dans la majorité des cas, les malades sont mutés pour le gène *FBN1* ce qui se traduit par un assemblage insuffisant de fibrilline-1 en microfibrilles. Il a été démontré qu'ADAMTSL6 est capable d'interagir avec la fibrilline-1 et de favoriser la formation des microfibrilles (Tsutsui et al. 2010). Partant de ce constat, une équipe a montré *in vivo* dans un modèle murin de MFS, que l'injection d'un gel contenant la protéine recombinante ADAMTSL6 régule la formation des microfibrilles de fibrilline-1 et favorise ainsi la séquestration du TGF β (Saito et al. 2011). De plus, les souris transgéniques qui surexpriment ADAMTSL6 présentent un excès de formation des fibres de fibrilline-1. ADAMTSL5 a également la capacité de se lier *in vitro* à la fibrilline-1 (Bader et al. 2012).

Les protéines de la famille ADAMTSL actuellement caractérisées fonctionnellement sont donc impliquées dans la formation des fibres de fibrilline-1, jouant ainsi un rôle sur la séquestration du TGF β .

- ADAMTSL1 et ADAMTSL3, deux protéines orphelines de fonction

Très peu de connaissances sont disponibles sur les protéines ADAMTSL1 et ADAMTSL3 à l'exception de :

- leur structure : ADAMTSL1 a 8 isoformes différents mais la mieux décrite est la forme courte, composée de 525 acides aminés. Elle contient un domaine thrombospondine de type 1 (TSR1) en N-terminal, suivi d'un domaine riche en cystéine et d'un « spacer », puis 3 domaines TSR en C-terminal. Cette partie est

commune à ADAMTSL3 avec 68% d'homologie en termes d'acides aminés. ATL3 est beaucoup plus longue (1690 acides aminés) et contient 8 répétitions TSR en supplément, 3 domaines de type immunoglobuline ainsi qu'un domaine PLAC.

- leur modification post-traductionnelle: il a été décrit que les répétitions thrombospondine de type I d'ATL1 peuvent être O-fucosylées et C-mannosylées afin d'améliorer la sécrétion de la protéine. Ces modifications n'ont pas été démontrées pour ADAMTSL3 mais, vu l'homologie entre les deux protéines, il est possible qu'ATL3 subissent aussi ce type de modifications post-traductionnelles (Wang et al. 2007).
- leur éventuelle implication dans la tumorigenèse : ATL3 est ressortie dans une étude de génomique à grande échelle comme étant un gène fréquemment muté dans les cancers colorectaux au même titre qu'*APC* et *TP53*. Une autre étude allant dans le même sens a montré que l'ARNm d'ATL3 est fortement diminué dans une cohorte de 10 cas en comparant tissus tumoraux/tissus sains (Koo et al. 2007). ATL1, quant à lui, pourrait être impliqué dans le développement de chondrosarcomes. En effet, l'étude des gènes dérégulés après inhibition de la voie Hedgehog par l'inhibiteur IPI-926 dans des xénogreffes a montré que l'expression d'ATL1 est fortement diminuée. Les auteurs ont également observé qu'ATL1 peut augmenter la prolifération dans des lignées primaires de chondrosarcomes (Campbell et al. 2014).

Les protéines ATL1 et 3 restent donc mal caractérisées sur le plan fonctionnel. Le deuxième axe de travail de ma thèse a été de définir la fonction de ces protéines, notamment à l'aide d'un modèle murin invalidé pour ATL1. Au regard de la bibliographie, nous nous sommes ensuite concentré sur les tissus musculaires et cartilagineux.

2. Caractérisation fonctionnelle d'ADAMTSL1 : état des connaissances et hypothèse de travail

2.1. MADD-4 orthologue de ADAMTSL1/3, un nouveau facteur de guidage pour UNC-40

Chez *C. elegans*, les cellules musculaires de la paroi du corps, nécessaires à la courbure et à la locomotion, sont rattachées à la cuticule, mais également couplées entre elles par des synapses électriques. Elles projettent des extensions non contractiles composées d'actine appelées bras musculaires. Ces bras musculaires se projettent en direction des moto-neurones qui les innervent afin de former une jonction neuromusculaire. Les axones de ces moto-neurones se trouvent soit dans les cordes nerveuses ventrales, soit dans les cordes nerveuses dorsales. MADD-4 (Muscle Arm Development Defective-4), orthologue de ADAMTSL1 et 3 chez *C. elegans*, est une molécule de guidage sécrétée par les cordes nerveuses dorsales et ventrales, qui a été mise en évidence en 2011. MADD-4 participe à

l'attraction des bras musculaires vers les moto-neurones. De façon intéressante, cette attraction est dépendante de UNC-40, l'orthologue de DCC. Il avait déjà été montré qu'UNC-40 jouait un rôle dans la mise en place de ces structures *via* UNC-6, par l'étude du phénotype de ces mutants (Alexander et al., 2009). Cependant il est intéressant de noter que contrairement aux mutants UNC-40, les mutants UNC-6 ne présentent pas de défauts d'extension des bras musculaires au niveau de la ligne médiane ventrale (lieu de sécrétion de UNC-6). La découverte de MADD-4, nouveau ligand de UNC-40, peut permettre d'expliquer ces différences phénotypiques entre UNC-6 et UNC-40. De la même façon, les mutants invalidés pour MADD-4 présentent des défauts de projection au niveau dorsal mais pas ventral. Il semble donc y avoir une coopération entre UNC-6 et MADD-4 au travers de UNC-40 pour le guidage des bras musculaires au niveau ventral. MADD-4 joue également un rôle dans le guidage des neurones sensoriels AVM et PVM par l'intermédiaire de UNC-40 (Seetharaman et al. 2011). Le co-récepteur transmembranaire EVA-1 forme un complexe EVA-1/UNC-40/MADD-4 et permet de sensibiliser UNC-40 à MADD-4 en présence de UNC-6, ce qui augmenterait la capacité des extensions à rejoindre leur cible dans un environnement riche en UNC-6.

Chez le nématode, MADD-4 semble aussi être impliqué dans l'organisation des récepteurs au GABA de type A (GABA_A), neurotransmetteur inhibiteur au niveau des jonctions neuromusculaires (JNM). L'isoforme de MADD-4, MADD-4L est sécrété par les neurones cholinergiques dans la synapse des JNM, où il induit le clustering post-synaptiques des récepteurs à acétylcholine. L'isoforme MADD-4B en revanche est sécrété par les neurones cholinergiques, mais également par les moto-neurones de type GABA et semble inhiber le recrutement des récepteurs GABA aux JNM cholinergiques. Ce rôle de MADD-4 dans l'organisation des récepteurs au GABA nécessite comme pour le guidage des bras musculaires la présence d'UNC-40. On retrouve en effet dans les mutants UNC-40, 70% de récepteur GABA_A en moins dans les boutons GABAérgiques. MADD-4B recrute UNC-40 à une localisation post-synaptique et induit probablement sa signalisation, ce qui semble favoriser le regroupement des récepteurs GABA_A (Tu et al. 2015).

2.2. D'une protéine matricielle à un partenaire possible de DCC : hypothèses de travail

Comme décrit ci-dessus, MADD-4 interagit fonctionnellement avec la voie UNC-40/UNC-6 chez *C. elegans*. La fonction des orthologues de MADD-4, ADAMTSL1 et 3 restent à l'heure actuelle inconnue. Chez l'Homme, les protéines ADAMTSL ont été majoritairement décrites pour leur implication dans la séquestration du TGF β et la biogenèse des microfibrilles. Dans ce contexte, nous avons émis les hypothèses suivantes :

- ADAMTSL1 pourrait être un nouveau partenaire de DCC, interférant possiblement avec la nétrine-1 et modulant l'activité apoptotique de DCC.
- ADAMTSL1 pourrait, comme les autres membres de la famille ADAMTSL, être impliquée dans la modulation de la MEC et la séquestration du TGF β . Vu son

expression majoritaire dans le muscle squelettique et son rôle dans la prolifération des cellules de chondrosarcomes, il est possible qu'ADAMTSL1 joue un rôle particulier dans les tissus musculaires et cartilagineux. Nous avons utilisé pour répondre à cette hypothèse un modèle murin invalidé pour ADAMTSL1.

3. Résultats

3.1. Matériel et méthodes

Matériel biologique

Lignées cellulaires : les lignées HEK 293T (cellules embryonnaires humaines de rein), SW1353 (chondrosarcomes) ont été cultivées en milieu Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Invitrogen) supplémenté par 10% de SVF et 1% de pénicilline/streptomycine + 1% de fungizone.

Plasmides : les plasmides codant pour ADAMTSL1 (isoforme de 525 acides aminés, ENST00000327883.11) et ADAMTSL3 (1690 acides aminés, ENST00000286744.9) sont un cadeau du Dr S. Apte (Dep. of Biomedical Engineering, Lerner Research Institute, Cleveland, USA) et ont été sous-clonés dans le vecteur pcDNA3.1/myc-Histidin à l'aide du kit Directional TOPO cloning (ThermoFisher Scientific).

Anticorps : nous avons utilisé les anticorps commerciaux anti-c-myc au 1/5000e (H5546, Sigma), anti-hemagglutinin au 1/1000e (HA) (H6908, Sigma), anti-DCC au 1/500^e (554223, Pharmingen), anti-nétrine-1 au 1/250e (Af1109, R&D).

Protéines recombinantes : nous avons utilisé pour les tests d'immunoprécipitation la nétrine-1 recombinante de chez R&D (1109-N1) à 10 ng/mL.

Souris

Les animaux sont hébergés en portoir ventilé, et avec de l'eau et de la nourriture à disposition sur la plateforme Anican agréée par le comité d'éthique animale.

Etude du patron d'expression d'ATL1 chez la souris

Les souris C57BL/6 âgées de 6 semaines, 13 semaines, 8 mois et 10 mois, en fonction des disponibilités du fournisseur et afin d'avoir un panel d'âges large, ont été commandées chez Charles River. Après mise à mort, les organes (cœur, cerveau, foie, poumon, rate, rein, testicules/ovaires, appendice xiphoïde, condyle, diaphragme, muscle gastrocnémien, tibia, vertèbre) ont été prélevés et congelés immédiatement dans l'azote puis conservés à -80°C jusqu'à l'extraction.

Etude phénotypique des souris invalidées pour ATL1

Les souris ADAMTSL1 de fond génétique 129/Sv sont issues de cellules ES dans lesquelles l'exon 1 du gène ATL1 a été invalidé par recombinaison homologue (Mutant Mouse Resource and Research Center). Les souris ont tout d'abord été croisées 12 fois par des

souris C57BL/6 afin d'obtenir des souris invalidées pour ATL1 en fond génétique C57BL/6 pur.

Pour l'étude de leur masse, les souris ont été pesées de manière hebdomadaire pendant 6 mois et les pesées comparées entre individus issus d'une même portée.

Prélèvement des muscles pour l'analyse histologique :

Les muscles de souris ont été prélevés et directement inclus dans de la gomme tracasganthe avant d'être congelés dans de l'isopentane refroidi à -145°C. Ils sont ensuite conservés à -80°C. Les marquages hématoxyline/éosine, laminine et chaîne lourde de myosine ont été réalisés en collaboration avec le Dr P. Castets (Biozentrum, Bâle).

Production de milieu conditionné

8 µg de plasmide contrôle ou ATL/ATL3 taggués myc ont été transfectés dans $1.5 \cdot 10^6$ cellules HEK 293T avec 10 µL de transfectant Jet Prime (Polyplus) dans 500 µL de tampon selon les instructions du fabricant. Après 48h d'incubation dans un milieu sans sérum, les différents milieux conditionnés sont collectés puis centrifugés 15 min à 6000 g à 4°C afin d'éliminer les débris cellulaires.

Co-immunoprécipitation (co-IP)

A J-0, 1 million de cellules HEK293T par condition sont mises en culture dans des boîtes de 10 cm de diamètre. A J-1, les cellules sont transfectées par 5 µg de nos plasmides d'intérêt (DCC-HA, ATL1-myc, ATL3-myc) à l'aide de 10 µL de réactif JetPrime dans 500 µL de tampon (Polyplus, POL114), selon les instructions du fabricant. Les cellules sont récoltées après 48h d'incubation soit dans un milieu normal, soit dans un milieu contenant de la nétrine-1 recombinante à 10 ng/mL ou encore dans du milieu conditionné par ATL1 ou ATL3. Le culot cellulaire est ensuite lysé dans 100 µL de tampon RIPA (50mM Tris-HCl, pH7.5, 150mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 1 mM EDTA, protease inhibitor cocktail and 5mM DTT), soniqué et incubé 1 heure à 4°C. Après centrifugation, le surnageant est incubé sur la nuit avec l'anticorps approprié dilué au 1/100^e. Le lysat est ensuite incubé avec des billes d'agarose couplées à la protéine G puis lavé avec du RIPA. Les fractions totales prélevées avant incubation avec les billes et immunoprécipitées sont ensuite analysées par western blot.

Immunoblot

20 µg d'extraits protéiques sont chargés par ligne sur gel de polyacrylamide 4-20% (Biorad) puis transférés sur membrane PVDF (Millipore). La membrane est ensuite bloquée 1h à température ambiante dans une solution de blocage (PBS Tween20 0.1%, lait en poudre 10%, BSA 5%) puis incubée sur la nuit à 4°C dans l'anticorps primaire d'intérêt (HA 1/1000, myc 1/5000, nétrine-1 1/1000). Après 3 lavages dans du PBS Tween20 0.1%, la membrane est incubée 1h à température ambiante dans l'anticorps secondaire (1/10 000) puis révélée à l'aide du système West Dura Chemiluminescence (Pierce).

ELISA

350 µL de milieu conditionné sont ajoutés dans les puits d'une microplaque 96 puits (Nunc-Immuno, maxisorp, Nalgene Nunc International) et incubés 1h à 37°C. Cette étape est répétée une seconde fois. Les puits sont ensuite lavés 3 fois à l'aide d'une solution de blocage (PBS, Tween20 0.05% + BSA 5%) puis incubés 1h30 à 37°C avec 100 µL d'anticorps anti-myc au 1/500^e en solution de blocage. Les puits sont à nouveau lavés 3 fois avant l'ajout de 100 µL d'anticorps secondaire anti-souris au 1/1000^e en solution de blocage. La détection est réalisée par ajout de solution d'ECL (Pierce) incubée 5 min. Le signal est mesuré sur le lecteur Infinite 500 (Tecan).

Extraction d'ARNm au TRIzol

Les tissus musculaires et cartilagineux réduits en poudre par cryobroyage sont repris dans 1 mL de réactif TRIzol (Invitrogen) puis incubés 15 min sur roue à 4°C. 200 µL de chloroforme est ajouté puis le mélange, agité vigoureusement, est incubé 7 min avant d'être centrifugé 15 min à 8000 g à 4°C. La partie aqueuse est prélevée et 500 µL d'isopropanol lui sont ajoutés. Le mélange est incubé 7 min puis centrifugé 15 min à 8000 g à 4°C. Le culot est ensuite lavé 2 fois à l'éthanol 70% avant d'être repris dans 15 µL d'eau.

RT-PCR quantitative

L'ARNm total des cellules/tissus est extrait à l'aide du kit Nucleospin RNAII (Macherey-Nagel). Les tissus cartilagineux et musculaires en revanche, sont cryobroyés puis leur ARNm extrait à l'aide d'un protocole classique d'extraction au Trizol. 1 µg d'ARNm est utilisé pour faire une transcription inverse par le kit iScript cDNA synthesis de Biorad. La RT-PCR quantitative est ensuite réalisée sur l'appareil LightCycler 2.0 (Roche) à l'aide du kit Light Cycler FastStart DNA Master SYBERGreen I de Roche.

Mesure de l'activité caspase 3

Les cellules HEK 293T sont mises en culture à une densité de 100.000 cellules par puits de plaque 6 puis à J-0, puis transfectées à J-1, par 1 µg des plasmides d'intérêt (contrôle, DCC, ATL1) avec 2 µL de réactif Jet Prime dans 100 µL de tampon. A J-2, le milieu des cellules est remplacé par du milieu à 0% de sérum afin d'induire un stress. A J-3, les cellules sont récoltées et l'index apoptotique mesuré à l'aide du kit Caspase 3/ CPP32 Fluorimetric Assay (Gentaur Biovision).

Coloration de l'os et du cartilage d'embryons murins

Les embryons sont prélevés à J-21, et mis à mort par exposition à 4°C, selon le protocole recommandé par le comité d'éthique animale. Les viscères et la peau sont éliminés puis les embryons fixés 24h dans de l'éthanol absolu. Les embryons sont ensuite plongés dans les bains suivants : bleu alcian (10 % dans 1 volume d'acide acétique et 4 volumes d'éthanol absolu) 3 jours, éthanol absolu 5 jours, KOH 1% 6 jours, rouge alizarine (0,001 %) 2 jours, KOH 1% 2 jours, glycérol 25% 2 jours, 50% 2 jours et 75% pour le stockage.

Lésion musculaire par injection de cardiotoxine

Cette expérience a été réalisée en collaboration avec l'équipe du Dr Rémi Mounier (Institut NeuroMyoGène, CNRS UMR 5310, INSERM U1217, Université Claude Bernard Lyon 1).

Les souris âgées de 8 semaines sont anesthésiées à l'isoflurane puis la patte antérieure rasée. 50 microlitres de cardiotoxine (Latoxan, France) à 0.03 mg/mL sont injectés dans la loge du muscle tibialis anterior. 28 jours après l'injection, les souris sont mises à mort et le muscle lésé prélevé, pesé puis monté dans de la gomme tragacathe avant d'être immédiatement refroidi dans de l'isopentane à -145°C. Les muscles sont ensuite coupés puis colorés à l'hématoxyline/éosine ainsi qu'au noir soudan pour colorer les gouttelettes lipidiques.

3.2. Expression d'ADAMTSL1 dans le cancer colorectal

Nous avons voulu vérifier si comme ADAMTSL3, l'expression d'ADAMTSL1 est dérégulée dans les cancers du côlon. L'idée sous-jacente était qu'ATL1 étant susceptible de moduler l'interaction DCC/nétrine-1, son expression ou sa fonction pouvait être altérée dans ces cancers, dans lesquels ce couple RD/ligand a été impliqué. Pour cela nous avons analysé l'expression d'ATL1, mais également celle d'ATL3 utilisé comme contrôle positif, dans une cohorte de carcinomes colorectaux ([Figure 22](#)). Nous avons ainsi confirmé que l'ARNm d'ATL3 est diminué de façon conséquente, soit 3.2 fois, dans ce type de tumeurs et apporté l'évidence que celui d'ATL1 l'est également, avec une expression moyenne 6 fois plus faible dans les échantillons tumoraux par rapport aux normaux. Nous avons également analysé l'expression de DCC et de la nétrine-1 dans cette cohorte. Comme attendu, l'expression de DCC est fortement diminuée dans le tissu tumoral par rapport au tissu sain contrôle. Le niveau d'expression de la nétrine-1 en revanche ne varie presque pas entre les deux types de tissus. DCC étant perdu par délétion chromosomique dans 70% des cancers, nous avons émis l'hypothèse que ATL1 pourrait moduler l'activité apoptotique de DCC et que la perte d'ATL1 dans les cancers colorectaux apporterait un avantage sélectif aux cellules tumorales, qu'elles aient conservé ou non DCC.

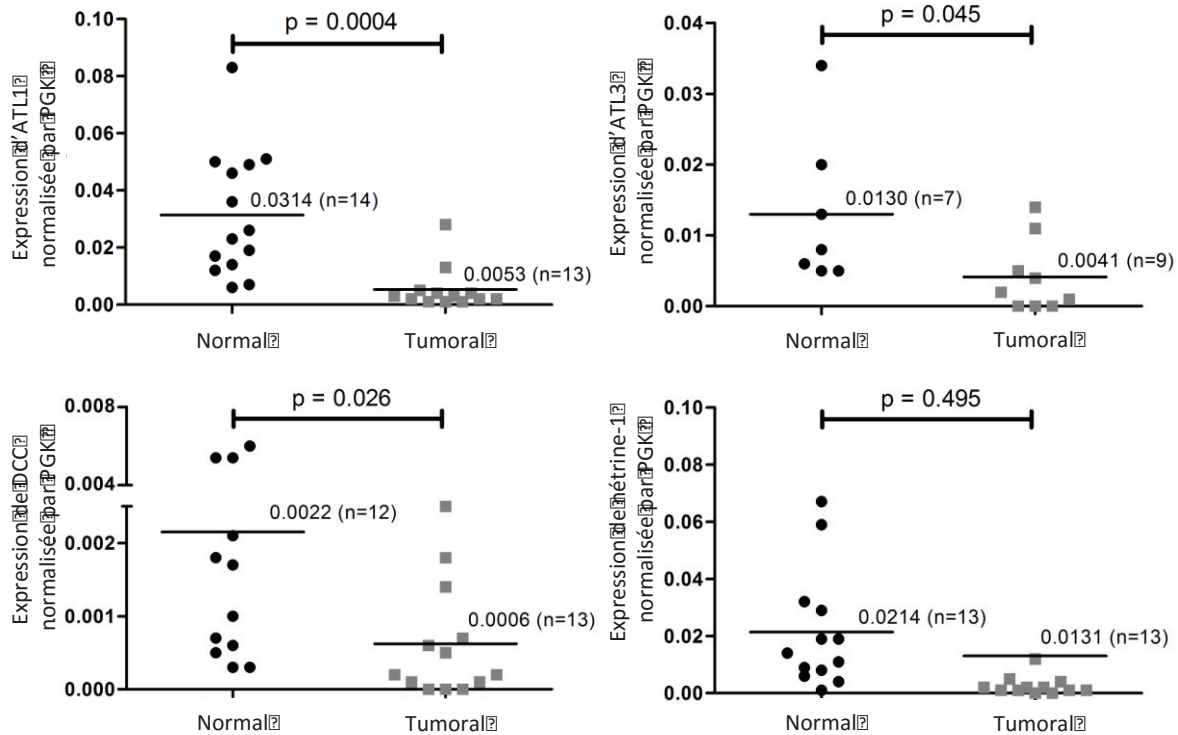


Figure 22 : Analyse de l'expression des gènes ATL1, ATL3, DCC et nétrine-1 dans une cohorte de carcinomes du côlon ainsi que dans le tissu normal adjacent. La quantification de l'expression des gènes a été réalisée par RT-PCR quantitative et normalisée par le gène de ménage PGK. Les données ont été analysées par un T-test de Student. Les barres transversales représentent la moyenne.

3.3. Etude de l'existence d'une interaction physique et fonctionnelle entre DCC et les protéines ADAMTSL1 et 3

- a) Les protéines ADAMTSL1 et 3, orthologues de MADD-4, sont-elles des interacteurs de DCC, orthologue de UNC-40 ?

L'interaction entre ATL1 ou ATL3 d'une part et DCC d'autre part, a été étudiée par co-IP. Pour cela, DCC a été transfecté dans des cellules HEK 293T en présence ou non d'ATL1 ou ATL3. Comme indiqué [Figure 23](#), un signal dont la taille est compatible avec celle d'ATL1 et ATL3 est détecté lorsqu'on immunoprécipite DCC, dans la condition où les deux protéines sont transfectées. Et réciproquement, un signal compatible à celui attendu pour DCC est détecté lorsqu'ATL1 ou ATL3 sont immunoprécipitées. Ceci suggère que DCC puisse interagir avec ATL1 et ATL3. Nous avons ensuite répété la même expérience de co-IP, mais en incubant les cellules 48h en présence ou non de nétrine-1 recombinante dans le milieu de culture. Comme le montre la [Figure 24](#), la présence de nétrine-1 ne perturbe pas l'interaction entre DCC et ATL1 ou ATL3, puisque, lorsque ces protéines sont immunoprécipitées, on détecte un signal correspondant à DCC même dans la condition nétrine-1. La réciproque ne semble pas vraie puisqu'il apparaît sur la [Figure 25](#) que

l'interaction entre la nétrine-1 et DCC est fortement diminuée lorsque l'IP est réalisée en présence d'un milieu conditionné contenant ATL1. Ce résultat a été confirmé par un test ELISA (non montré). Nous n'avons pas pu conclure sur l'implication d'ATL3 dans l'association DCC/nétrine-1 puisque la vérification par test ELISA nous a montré que la protéine n'est pas présente dans le milieu conditionné. Il y a donc un problème de sécrétion dans notre système. ATL1 en revanche pourrait donc moduler l'interaction entre DCC et la nétrine-1.

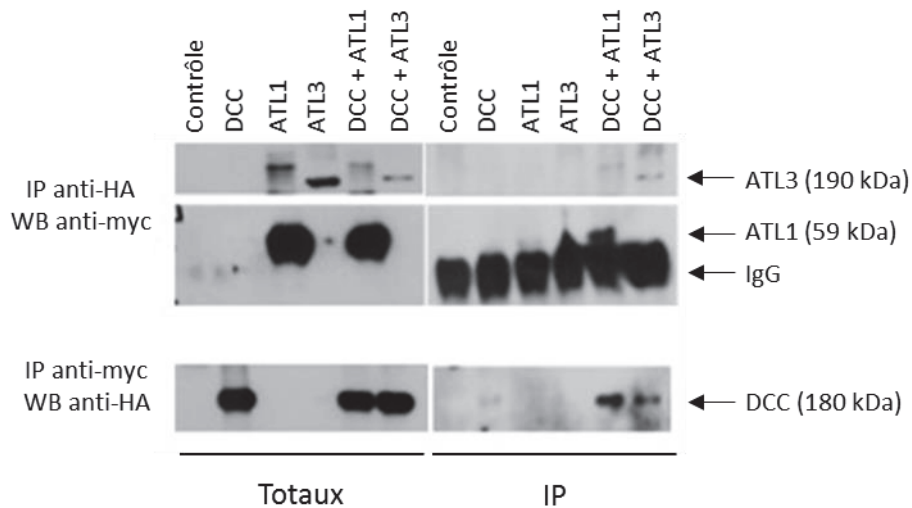


Figure 23 : Expérience de co-immunoprécipitation réalisée après transfection des cellules HEK 293T par les plasmides contrôle pcDNA, DCC taggué HA, ATL1 et ATL3 taggués myc. L'analyse en immunoblot permet de démontrer une interaction entre DCC et les protéines ADAMTSL1 et ADAMTSL3. Image représentative d'une expérience répétée au moins 3 fois.

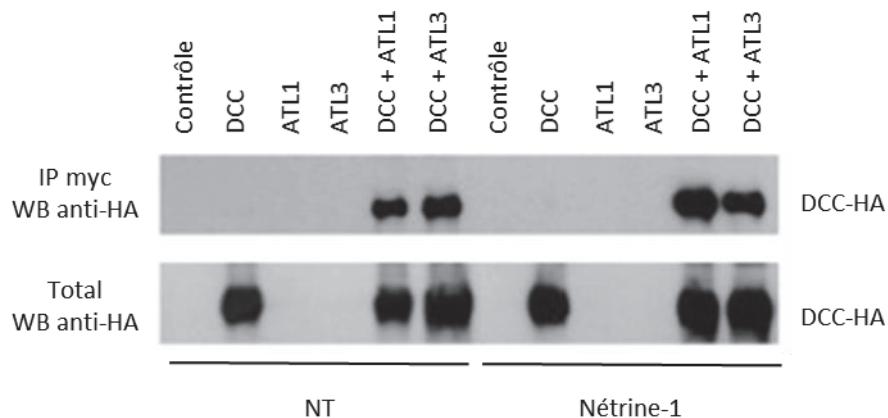


Figure 24 : Expérience de co-immunoprécipitation réalisée après transfection des cellules HEK 293T par les plasmides contrôles pcDNA, DCC taggué HA, ATL1 et ATL3 taggués myc. Les cellules sont ensuite incubées 48h avec de la nétrine-1 recombinante (10 ng/mL) ou bien non traitées (NT). L'analyse en immunoblot permet de démontrer que l'ajout de nétrine-1 ne perturbe pas l'interaction entre DCC et les protéines ADAMTSL1 et ADAMTSL3. Image représentative d'une expérience répétée au moins 3 fois.

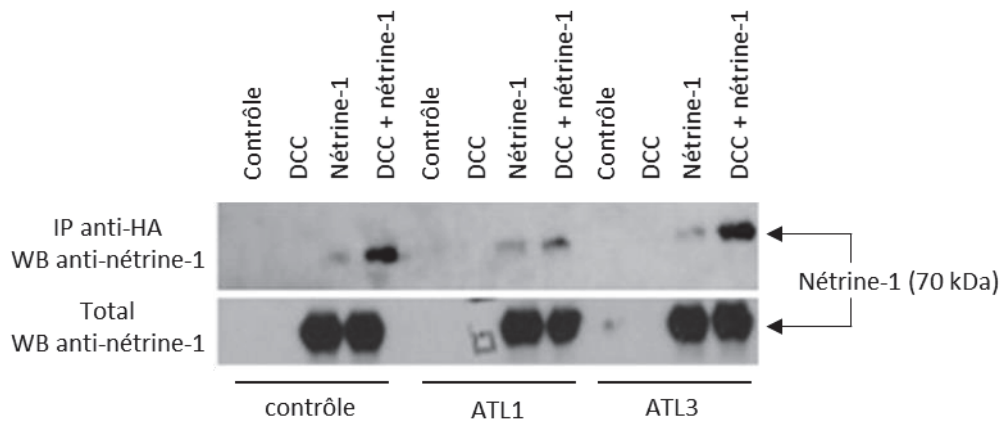


Figure 25 : Expérience de co-immunoprécipitation réalisée après transfection des cellules HEK 293T par les plasmides contrôles pcDNA , DCC taggué HA ou nétrine-1. Les cellules sont ensuite incubées 48H avec du milieu conditionné contrôle, ADAMTSL1 ou ADAMTSL3. L'analyse en immunoblot montre clairement que la présence d'ADAMTSL1 dans le milieu diminue l'interaction entre la nétrine-1 et DCC. Image représentative d'une expérience répétée au moins 3 fois.

b) Modulation de l'activité apoptotique de DCC par ATL1

Les données obtenues chez *C. elegans* montrent que MADD-4 pourrait être un ligand de UNC-40 modulant son activité dans le guidage axonal en collaboration avec UNC-6. Nous avons voulu voir si dans des cellules humaines, ATL1 pouvait moduler l'activité apoptotique de DCC. DCC est un RD, il induit donc de l'apoptose lorsqu'il est exprimé dans les cellules stressées par la méthode de déprivation en sérum. Nous avons utilisé la co-transfection de plasmides pour surexprimer DCC et/ou ATL1 de manière transitoire dans les cellules HEK 293T. On observe effectivement sur la [Figure 26](#) une induction de l'activité caspase 3, utilisée comme marqueur permettant de mesurer l'apoptose, lorsque DCC est transfecté. Or, si on co-exprime DCC et ATL1 dans les cellules, on observe une nette diminution de l'activité caspase 3.

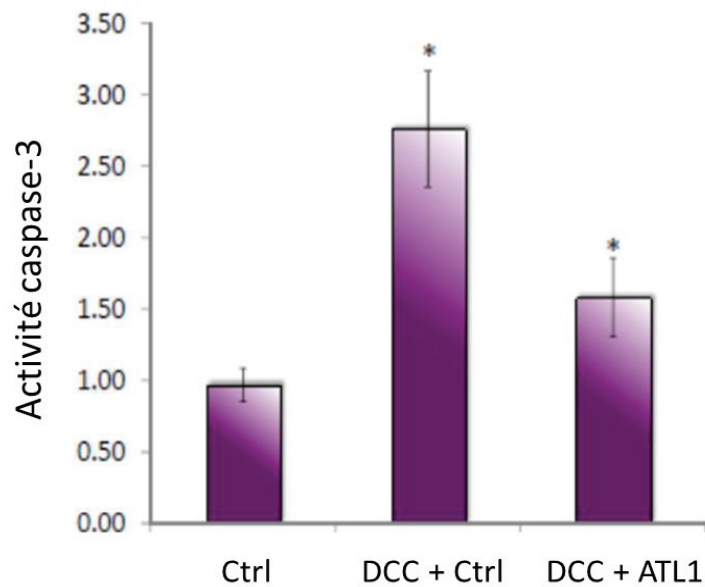


Figure 26 : Index de l'activité caspase 3 dans les cellules HEK 293T après transfection avec les plasmides contrôle (ctrl), DCC et ATL1. DCC étant un RD, sa transfection induit une augmentation de l'index apoptotique mesuré dans les cellules. La co-transfection d'ATL1 induit une diminution significative de l'activité caspase 3. Résultats : moyenne +/- écarts types, n=3. Etoile : $p < 0.05$, T-Test Student.

Pour comprendre l'effet d'ATL1 sur DCC, nous avons vérifié les niveaux d'expression de DCC en condition de co-transfection avec ATL1. Comme le montre la [Figure 27](#), l'expression de DCC est fortement diminuée dans les conditions de surexpression d'ATL1 par rapport au contrôle. Ce résultat est visible à l'échelle protéique sur la protéine DCC transfectée (B) mais également pour la forme endogène (C). On observe de même une nette diminution de la quantité de DCC à l'échelle de l'ARNm (A) relativement au contrôle. Cette modulation d'expression est spécifique de DCC, puisque les niveaux d'expression de la nétrine-1, de UNC5B ou de la néogénine ne varient pas lorsque ATL1 est exprimé.

En réalité, nous avons fini par constater que ces résultats ne correspondaient pas à une inhibition de l'expression de DCC par ATL1, mais au phénomène inverse : le plasmide 3X Flag utilisé comme contrôle a pour effet, lorsqu'il est transfecté, d'augmenter l'expression de DCC par rapport à des cellules non traitées. Faute de temps, nous avons donc décidé de mettre de côté cette partie sur un lien fonctionnel entre DCC et ADAMTSL1, afin de nous concentrer sur la caractérisation des souris invalidées pour ADAMTSL1, dans le but ultime de déterminer la fonction de cette protéine chez les Mammifères.

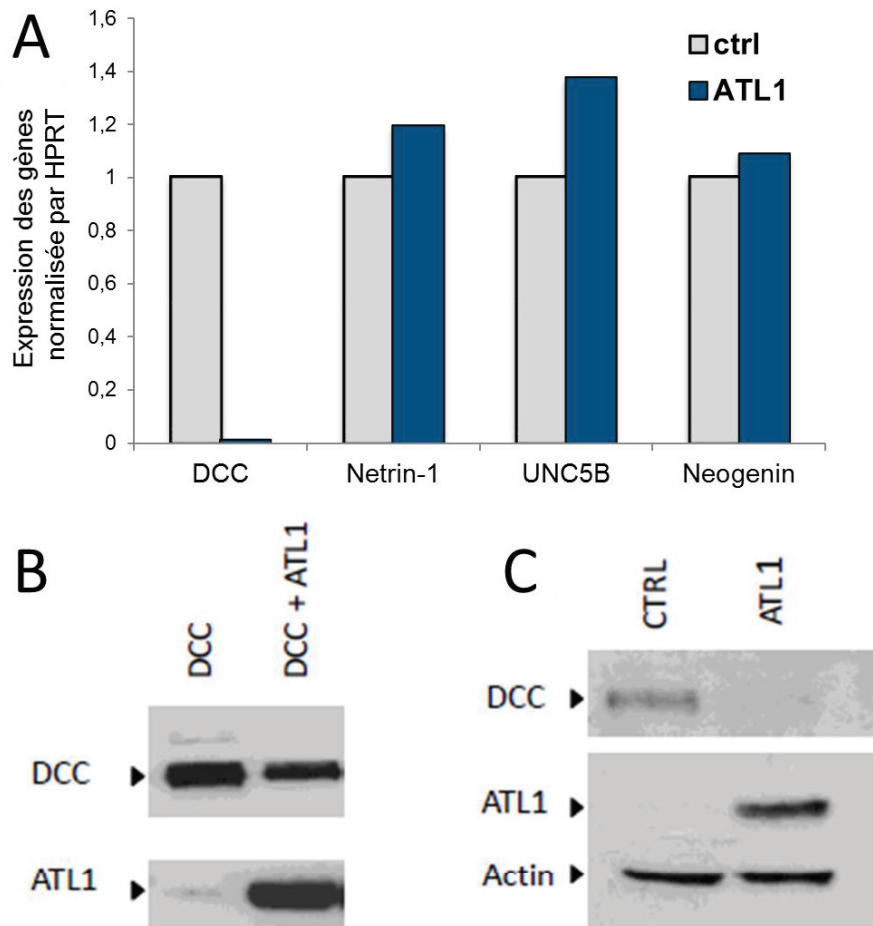


Figure 27 : Expression de DCC en fonction de la présence d'ATL1. (A) En présence d'ATL1, l'ARNm de DCC est fortement diminué alors que les ARNm de la nétrine-1 ou des récepteurs UNC5B et néogénine ne varient pas. Au niveau protéique, la transfection d'ATL1 induit une diminution de DCC qu'il soit transfecté (B) ou endogène (C).

3.4. Analyse du rôle d'ADAMTSL1 comme protéine matricielle : étude d'un modèle murin

ADAMTSL1 est une protéine sécrétée qui pourrait potentiellement agir au niveau de la MEC comme d'autres ADAMTSL. Deux éléments ont été décrits jusqu'à présent sur ADAMTSL1 chez les Vertébrés :

- Hirohata et al, ont montré par Northern Blot qu'ADAMTSL1 est fortement exprimée dans le muscle squelettique chez l'Homme et la souris (Hirohata et al. 2002).
- Campbell et al, ont démontré que l'expression d'ADAMTSL1 est notamment contrôlée par la voie Shh et qu'ATL1 est capable de réguler positivement la prolifération de cellules de chondrosarcomes (Campbell et al. 2014).

Nous avons donc émis l'hypothèse qu'ADAMTSL1 pourrait jouer un rôle dans la physiologie du muscle et/ou du cartilage et que cette fonction pourrait éventuellement passer par la séquestration du TGF β dans la MEC, comme c'est le cas d'ADAMTSL2 et

ADAMTSL6, deux membres de cette famille ((Le Goff et al. 2008; Saito et al. 2011, 6). Afin de répondre à ces questions, nous avons réalisé différentes analyses *in vitro* et *in vivo*, en utilisant notamment un modèle murin invalidé pour l'expression d'ADAMTSL1.

3.4.1. Etude du patron d'expression d'ADAMTSL1

Afin de déterminer le patron d'expression d'ATL1 dans les tissus adultes, nous avons effectué une étude approfondie en fonction de l'âge, du sexe et des tissus chez des souris sauvages de souche C57BL/6. Après mise à mort des souris, les tissus (cerveau, cœur, foie, poumon, rate, rein, testicule/ovaire, appendice xiphoïde, condyle, diaphragme, muscle gastrocnémien, os tibial, vertèbre) ont été prélevés puis l'ARNm extrait avant d'être analysé par RT-qPCR.

L'analyse a été réalisée à l'aide de 3 couples d'amorces différents : le premier à cheval sur les exon 3-4, le 2^e ciblant l'exon 12 et le dernier spécifique de l'exon 24 car cinq transcrits différents d'ATL1 sont décrits dans la base de données Ensembl. Ces 5 transcrits murins ont une composition différente au niveau de leurs exons :

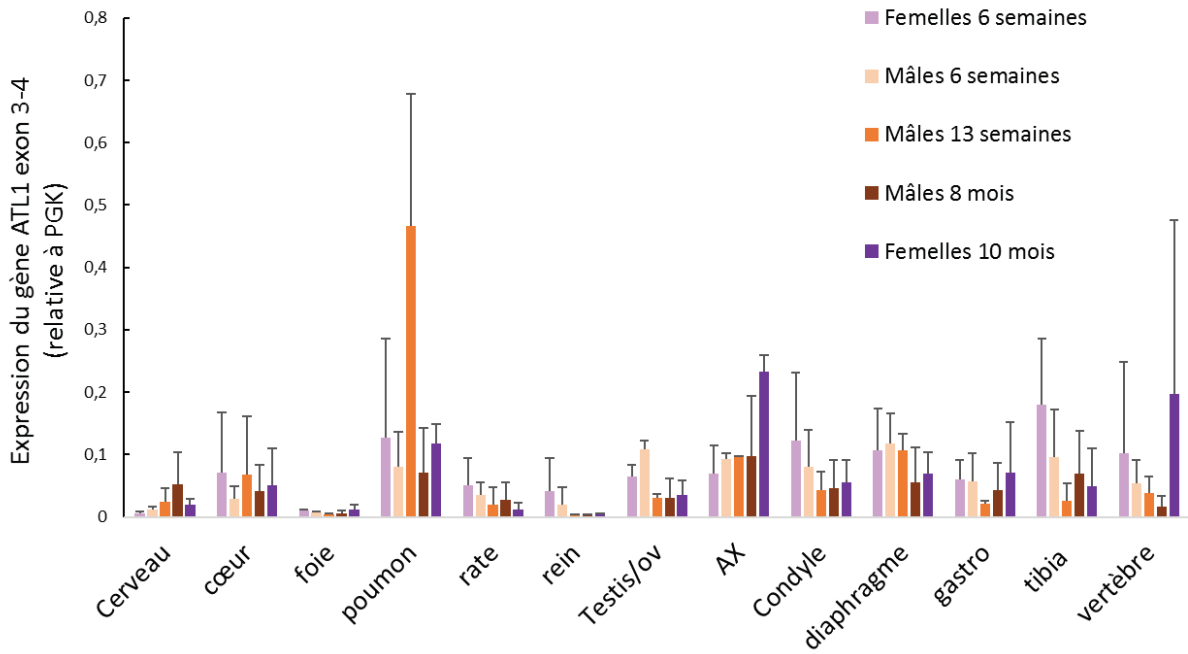
- ADAMTSL1-003 : exons 1 à 5 ;
- ADAMTSL1-008 : exons 5 à 9 ;
- ADAMTSL1-002 : exons 1 à 13 ;
- ADAMTSL1-001 : exons 1 à 29 ;
- ADAMTSL1-201 exons 1 à 28 ;

Les transcrits 002 et 001 correspondent respectivement aux isoformes courte et longue majoritaires de la protéine.

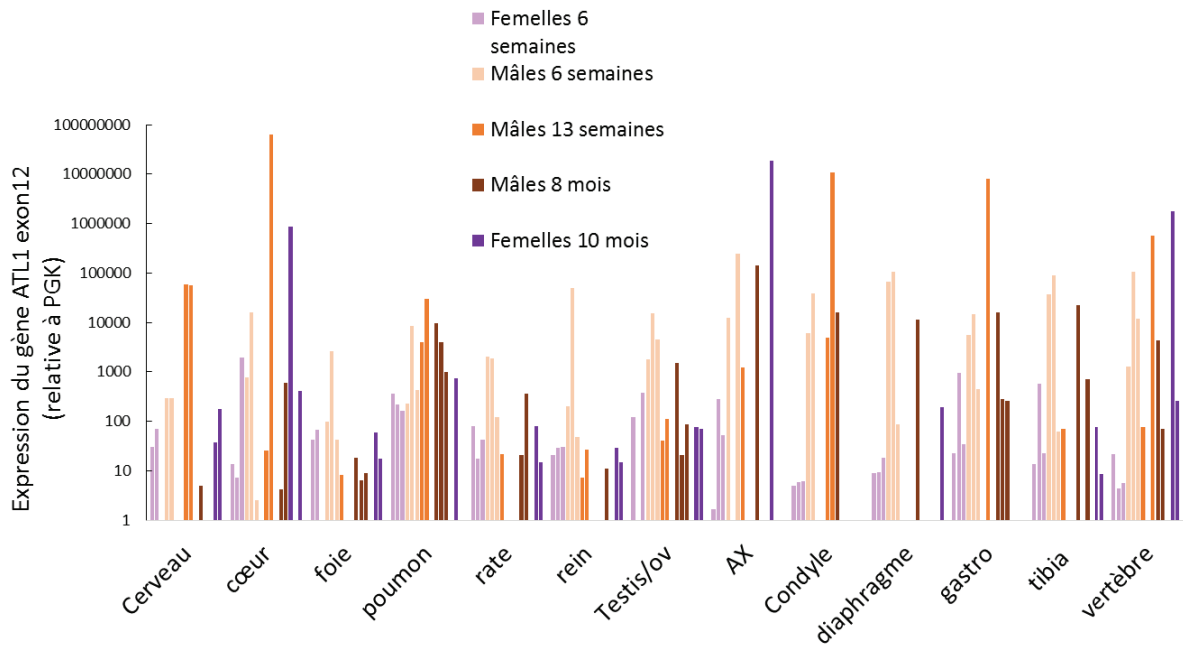
Nous avons observé que le profil d'expression d'ATL1 est très différent en fonction du couple d'amorces utilisé (Figure 28).

- Avec le premier couple d'amorces (A), permettant l'amplification des formes longues et courtes, l'analyse montre une expression d'ATL1 très faible dans le foie et le rein ainsi qu'un pic d'expression dans le poumon chez les mâles de 13 semaines. Il est intéressant de noter qu'ATL1 est bien exprimé dans les tissus musculaires et cartilagineux.
- Lorsque les amorces spécifiques de l'exon 12 (B) sont utilisées pour amplifier ATL1, on observe une expression très hétérogène entre les tissus mais surtout entre individus, puisque l'échelle de présentation est logarithmique. Ceci pourrait résulter du fait que l'exon 12 est un exon de transition entre différents transcrits, ou du design des amorces *per se*. Il semble compliqué d'utiliser ces résultats très variables pour analyser le patron d'expression du gène.
- Les amorces localisées dans l'exon 24 (C) sont spécifiques de la forme longue et révèlent un profil d'expression vraiment particulier du gène. En effet, on retrouve une expression d'ATL1 faible dans le cerveau et le poumon mais une expression forte et spécifique des tissus sexuels (testicules et ovaires), indiquant que cette forme longue d'ATL1 pourrait jouer un rôle spécifique et important dans ces tissus.

A



B



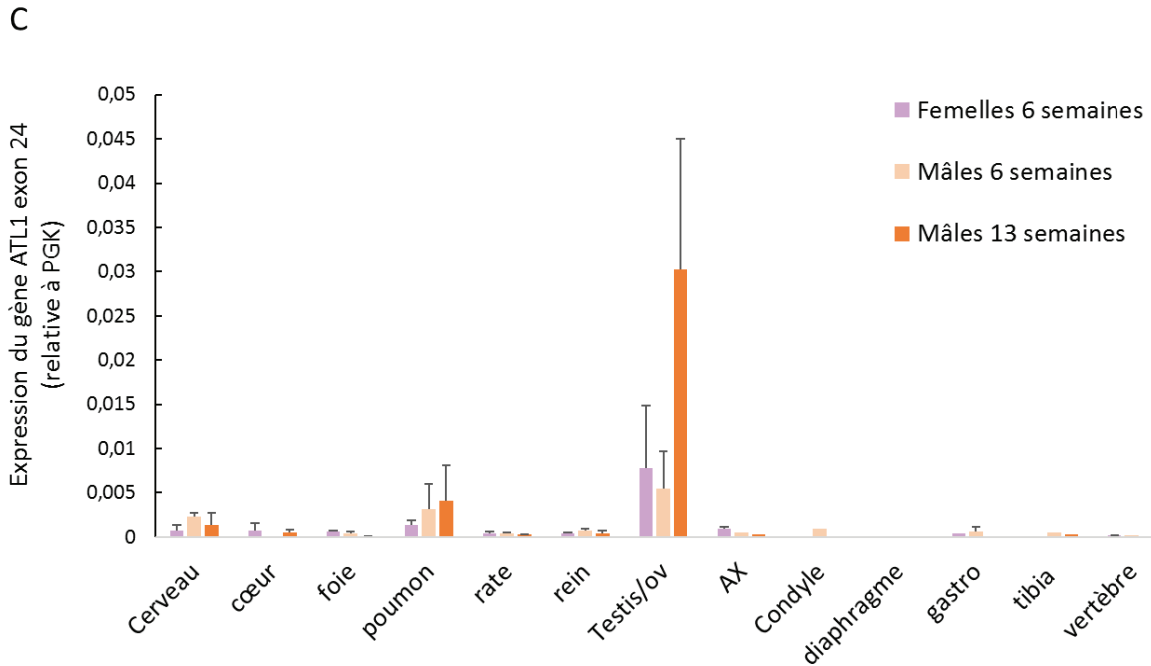


Figure 28 : Expression du gène ADAMTSL1 relative à PGK en fonction de l'âge, des organes et du sexe de souris C57BL6. L'expression d'ATL1 est testée par 3 couples d'amorces ciblant (A) l'exon 3-4, (B) l'exon 12, (C) l'exon 24 dans différents organes : cerveau, cœur, foie, poumon, rate, rein, organes sexuels (testicules ou ovaires) ainsi que dans des tissus cartilagineux (AX : appendice xiphoïde, Condyle et vertèbre) et musculaires (Diaphragme, muscle gastrocnémien) et osseux : tibia. Résultats : moyenne +/- écart moyenne de 3 individus pour chaque groupe d'âge et de sexe.

3.4.2. Etude phénotypique des souris invalidées pour ATL1

a) A l'échelle de l'organisme

La première étape de cette étude a consisté en la vérification de la validité du KO d'ADAMTSL. Nous avons pour cela prélevé différents organes d'une souris soit sauvage soit invalidée pour ATL1 issues d'une même portée puis analysé par RT-qPCR l'expression d'ATL1 à l'aide d'amorces ciblant les exon 1 et 2. Comme le montre la [Figure 29](#), l'expression d'ATL1 est bien perdue dans les souris invalidées pour ATL1, validant ainsi notre modèle d'étude. On retrouve une expression dans les testicules identique à celle des souris sauvages pouvant s'expliquer par la présence d'une isoforme spécifique de ce tissu.

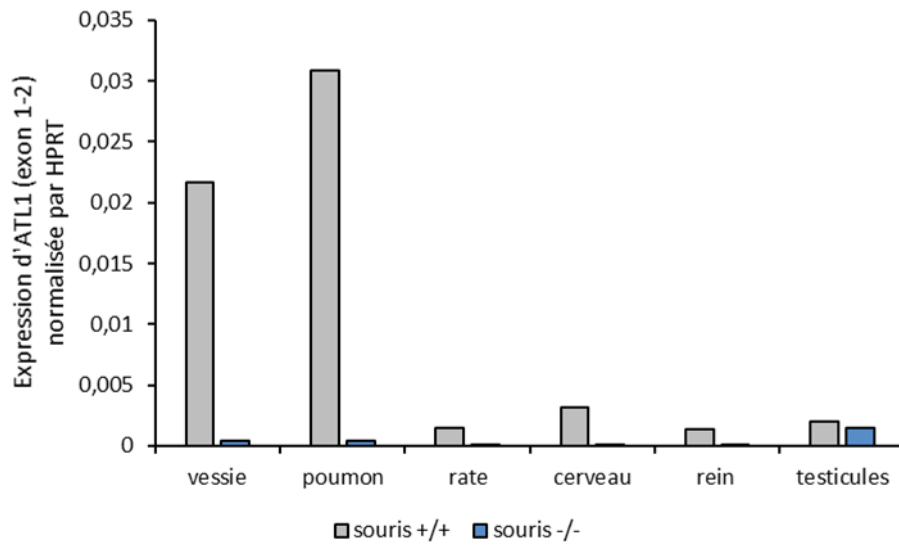


Figure 29 : Validation du modèle ATL1 KO par RT-qPCR. L'expression d'ATL1 a été analysée dans différents tissus issus de souris +/+ ou -/-. L'expression d'ATL1 est en effet fortement diminuée voire inexistante dans les souris KO pour ATL1, validant ainsi notre modèle.

Nous avons observé qu'à la naissance, les souris invalidées pour ATL1 semblaient présenter un poids inférieur aux autres individus de la portée. Nous avons donc effectué des pesées hebdomadaires des souris par portée et constaté effectivement une réduction de poids en moyenne de 10% pour les individus homozygotes par rapport à leurs congénères sauvages (Figure 30).

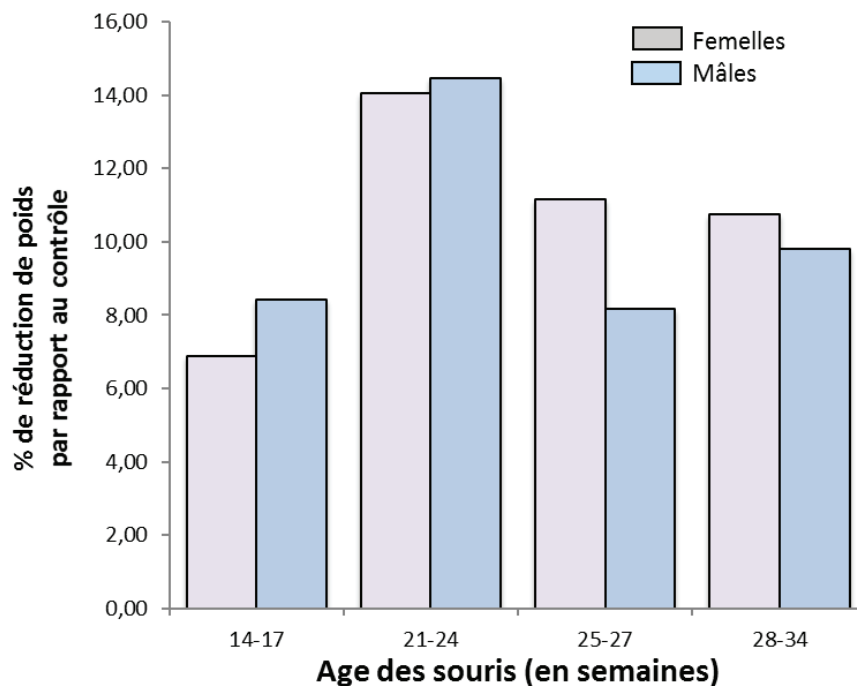


Figure 30 : Pourcentage de poids inférieur aux individus sauvages. Les individus de 10 portées ont été pesés de façon hebdomadaire sur une période de 6 mois. Les poids des individus homozygotes ont été rapporté au poids de leur congénère contrôle. Moyenne de 3 individus pour chaque génotype de chaque âge.

Afin de déterminer si cette différence de poids peut être dû à un problème de croissance osseuse, nous avons mesuré les tibias des souris de ces portées. La mesure de la longueur de cet os, rapporté à la taille totale de l'individu n'a pas révélé de différence entre les individus homozygotes $ATL1^{-/-}$ et contrôles. Nous avons également pesé différents muscles (tibialis anterior, cœur) afin de voir si nos souris KO présentent une hypertrophie ou atrophie musculaire. Cette étude n'a pas révélé de différence significative dans les ratios, par rapport au poids total de l'animal.

Comme le montre la [Figure 31](#), nous avons également observé, après euthanasie des souris par asphyxie au CO_2 , une asymétrie de la cage thoracique chez les souris homozygotes $ATL1^{-/-}$ et les souris hétérozygotes $ATL1^{+/-}$ par rapport aux souris sauvages. Ces deux groupes de souris présentent en effet une distension de la cage thoracique, du côté droit ou gauche.



Génotype :	+/+	-/-	+/-
Nombre total d'individus	7	8	7
Symétrie costale	7	1	2
Asymétrie costale	0	7	5
% asymétrie costale	0	88	71

Individus homozygotes $ATL1^{-/-}$

Figure 31 : Invalidation d'ADAMTSL1 et asymétrie costale. Panel gauche : exemple de phénotype observé chez des souris invalidées pour ADAMTSL1 âgées de 1 an et présentant une asymétrie costale du côté gauche ou du côté droit. Le tableau présente l'incidence de ce phénotype par rapport au génotype sauvage.

3.4.3. A l'échelle tissulaire

Afin de trouver l'origine de ces défauts et d'après le peu d'éléments bibliographiques dont nous disposons, nous nous sommes particulièrement concentrés sur le rôle d'ATL1 dans le muscle et le cartilage.

a) Etude de l'impact de l'absence d'ADAMTSL1 sur le cartilage

Comme mentionné dans la partie introductive, il a été montré qu'ATL1 serait impliqué dans le développement des chondrosarcomes, sous le contrôle de la voie Shh et des facteurs de transcription Gli. Ce papier indique que ATL1 favorise notamment la prolifération de lignées de chondrosarcomes. Compte tenu du rôle d'autres membres de la famille dans le maintien et le remodelage du cartilage, il était donc possible de supposer qu'ATL1 puisse jouer un rôle physiologique analogue. Nous avons tout d'abord cherché à

définir s'il existait des défauts développementaux de mise en place des structures cartilagineuses chez les souris invalidées pour ATL1. Pour ce faire, des souris ATL1^{-/-} et les contrôles de la même portée ont été mis à mort à un jour ou à 3 mois. Nous avons ensuite prélevé différentes structures cartilagineuses : l'appendice xiphoïde, la cage thoracique, l'articulation du membre inférieur et l'articulation du membre supérieur. Ces organes ont ensuite été inclus puis coupés au microtome et analysés histologiquement. Cette analyse réalisée en collaboration avec un anatomopathologiste vétérinaire de la plateforme Anican n'a révélé aucun défaut au niveau des chondrocytes ou de l'organisation des plaques de croissance. Nous avons ensuite déterminé l'indice de prolifération KI67 des chondrocytes dans les plaques de croissance d'une portée de souris âgées de 1 jour. Pour ce faire, les individus ont été mis à mort puis incisés le long des membres et de l'abdomen avant d'être fixés dans du formol. Les articulations ont ensuite été prélevées, décalcifiées et enfin coupées avant d'être colorées au KI67 afin de marquer les cellules en prolifération. Nous avons ensuite compté 6 plaques de croissance par individus (2 dans le membre inférieur, 2 dans le membre supérieur, 2 dans la zone costale) et fait le ratio du nombre de cellules positives au KI67 sur le nombre de cellules restantes. Comme le montre la [Figure 32](#) les souris ATL1^{-/-} (n=3) présentent une prolifération des chondrocytes de la plaque de croissance inférieure de 13% à celle des souris sauvages (n=3). Les individus hétérozygotes ont un phénotype intermédiaire avec une diminution de l'index de prolifération de 4.7% par rapport aux individus contrôle. La portée ne comportait cependant qu'un seul individu hétérozygote.

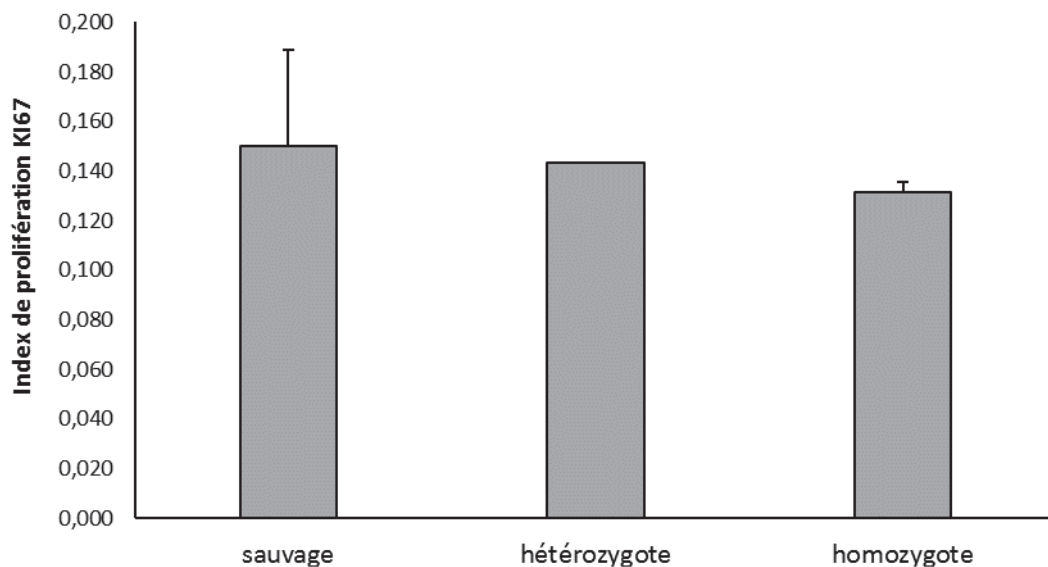


Figure 32 : Index de prolifération KI67 mesuré dans les plaques de croissance d'une portée d'individus de 1 jour sauvage (n=3), hétérozygote (n=1) et homozygote (n=3) pour ADAMTSL1. Le nombre de cellules marquées au KI67 est rapporté au nombre de cellules total. Résultats : moyenne +/- écart type.

Nous avons également réalisé une étude plus globale de l'ossification et de la mise en place du cartilage chez des embryons à J-21. Pour cela les fœtus ont été mis à mort puis colorés au bleu alcian pour marquer le cartilage et au rouge alizarine pour marquer l'os. Nous avons observé certaines différences comme le montre la [Figure 33](#) avec un embryon KO qui présente une forme de crâne plus plate que le WT ainsi que des processus transverses raccourcis ou absents sur certaines vertèbres (flèches rouges). Le nombre de côtes en revanche est le même chez les deux embryons et il n'y a pas de différence au niveau du stade de l'ossification.

Ces résultats, quoique très préliminaires, suggèrent qu'ATL1 puissent jouer un rôle dans la physiologie du cartilage. L'analyse d'un plus grand nombre de souris permettra de valider ou non ces observations.

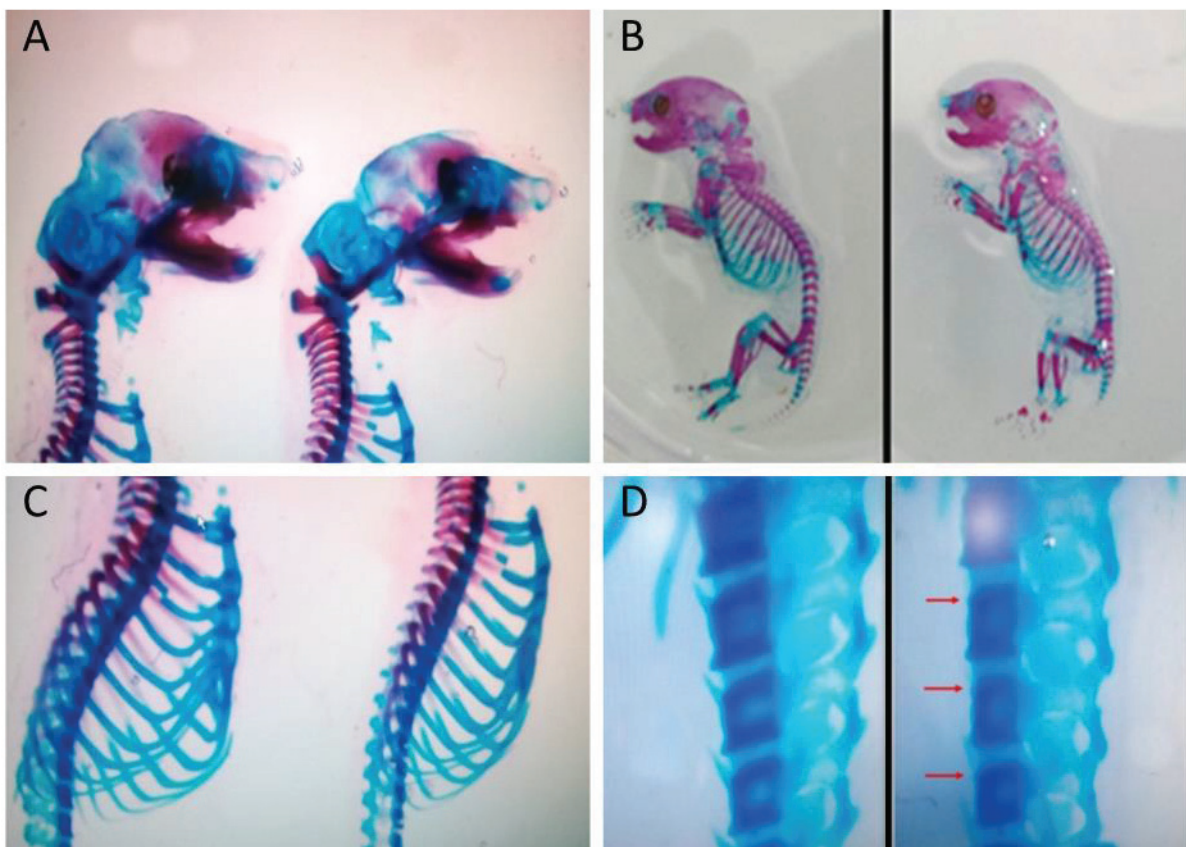


Figure 33 : Marquage d'embryons au bleu alcian et au rouge alizarine. Le bleu alcian permet une coloration du cartilage alors que le rouge alizarine marque l'os. Les embryons WT sont localisés à gauche sur les panels A, B C et D alors que les embryons ATL1 KO sont localisés à droite. Les processus vertébraux issus des arcs neuraxiaux des vertèbres semblent absents dans le cas où ATL1 est invalidé.

b) Etude de l'impact de l'absence d'ADAMTSL sur le muscle

D'après l'analyse par Northern blot effectuée par Hirohata et al., dans des tissus humains et murins, ADAMTSL1 semble fortement exprimé de façon spécifique dans le muscle squelettique. Nous avons confirmé ces résultats avec l'analyse en RT-QPCR de notre

cohorte de tissus de C57BL/6. Différents muscles (gastrocnémien, tibialis antérieur, diaphragme) ont ensuite été prélevés chez des souris $ATL1^{-/-}$ et sauvages inclus, coupés au cryostat puis analysés en histologie en collaboration avec le Dr P. Castets (Biozentrum, Bâle) après marquage hématoxiline/éosine ou co-marquage de la chaîne lourde de myosine et de la laminine, de manière à mettre en évidence d'éventuels défauts quantitatifs ou qualitatifs au niveau des tissus musculaires (Figure 34). Nous n'avons observé aucun défaut dans ces muscles, ni au niveau de la taille ou du type de fibre, ni de signe indiquant une régénération excessive (localisation centrale des noyaux au sein des fibres).

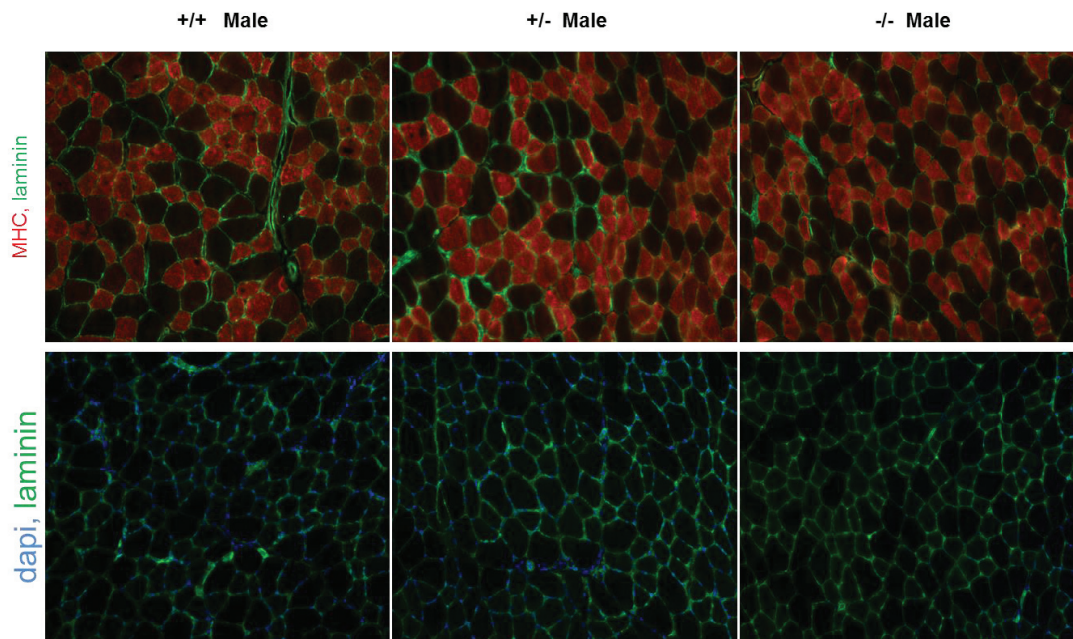


Figure 34 : Marquage IHC de coupes de muscle tibial antérieur. Les coupes de muscle de tibialis antérieur de souris sauvage, hétérozygote et homozygote ont été marquées pour la chaîne lourde de myosine marquant les fibres musculaires, la laminine marquant la lame basale ou le DAPI afin de marquer les noyaux. Aucune différence majeure n'a été observée. Image représentative des résultats obtenus, réalisée sur des souris âgées de un an.

Nous avons donc souhaité analyser le rôle d'ATL1 dans la régénération musculaire à l'aide du modèle classique d'injection de cardiotoxine (CTX) dans le muscle tibial antérieur de la patte. La CTX induit une nécrose totale du muscle, qui doit normalement être compensée sous 28 jours post-injection. Des souris $ATL1^{+/+}$, $ATL1^{+/-}$ et $ATL1^{-/-}$ âgées de 8 semaines ont donc été injectées au niveau du tibialis puis sacrifiées 28 jours après. Les muscles injectés ont été prélevés et analysés sur le plan histologique. De manière très intéressante, nous avons observé dans les souris invalidées pour ATL1 la présence important de gouttelettes lipidiques indiquant une mauvaise régénération du tissu (Figure 35). En effet, la présence d'adipocytes dans le muscle indique un défaut de régénération ou de l'intégrité musculaire. On retrouve cette caractéristique dans différentes maladies comme la dystrophie musculaire de Duchenne ou le diabète de type II (Uezumi et al. 2010). Nous avons marqué ces gouttelettes lipidiques à l'aide de noir

soudan afin i) de vérifier leur nature et ii) de quantifier leur importance. Comme présenté Figure 35 A et B, la surface de gouttelette lipidique par unité d'image est augmentée d'un facteur 3 pour la portée n°3 et 50 pour la portée n°4 dans les souris ATL1^{-/-} par rapport aux sauvages.

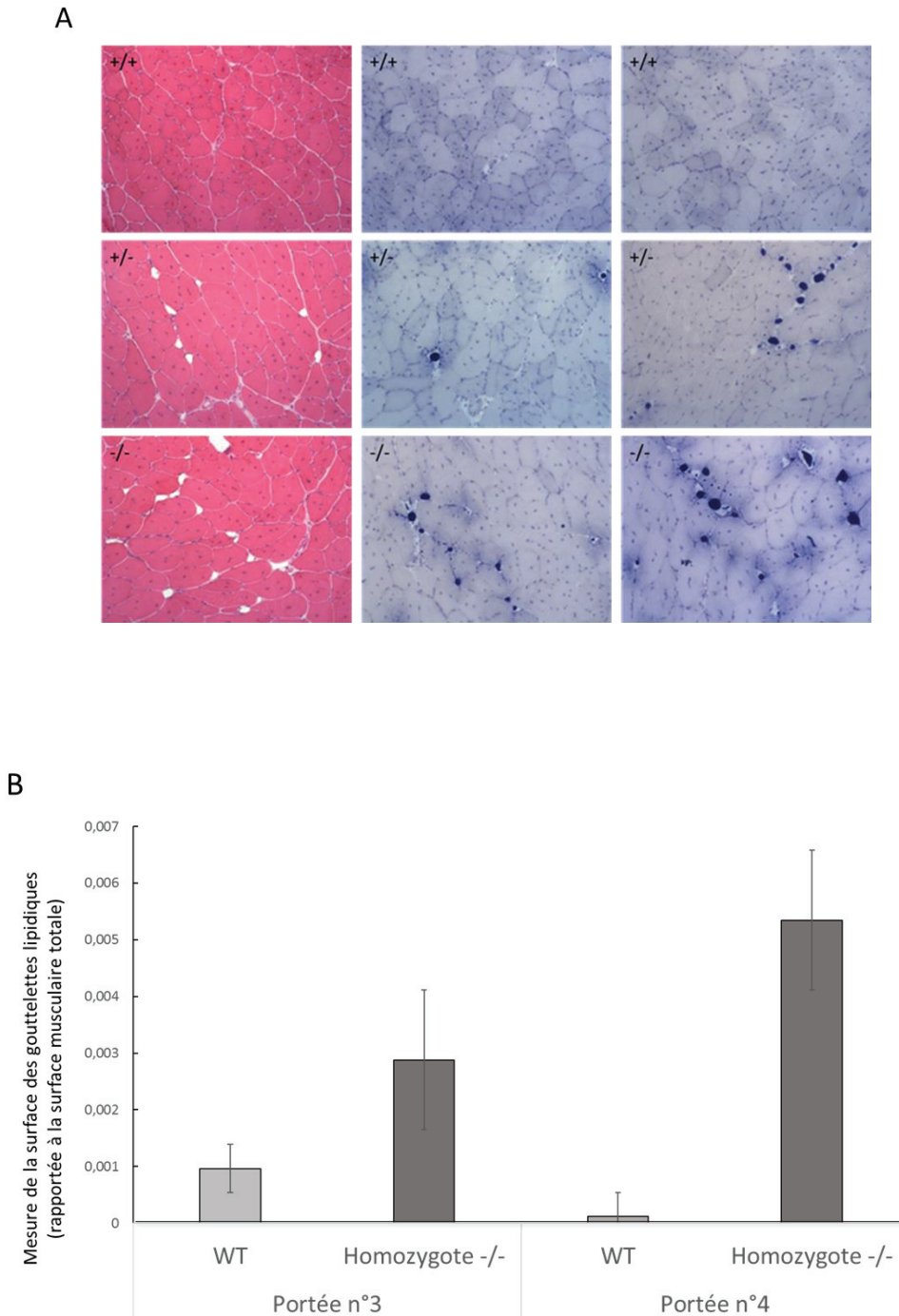


Figure 35 : Coloration hématoxyline (HE) et noir soudan (NS) de coupes musculaires après injection de cardiotoxine. (A) 28 jours après injection de CTX les muscles ont été récupérés, coupés et colorés à l'HE et au NS afin de marquer les gouttelettes lipidiques, marqueurs de mauvaise régénération. (B) Quantification de la surface des gouttelettes lipidiques par rapport à la surface musculaire totale.

Nous avons souhaité sur ces mêmes coupes étudier la localisation d'ADAMTSL1 au niveau du muscle squelettique. Nous avons pour cela réalisé un protocole d'immunofluorescence classique. Comme le montre la [Figure 36](#), on retrouve bien un marquage spécifique d'ATL1 (en vert) au niveau extracellulaire et plus précisément dans l'endomysium du muscle. Les souris invalidées pour ATL1 n'ont aucun marquage en dehors du bleu dû au DAPI marquant les noyaux.

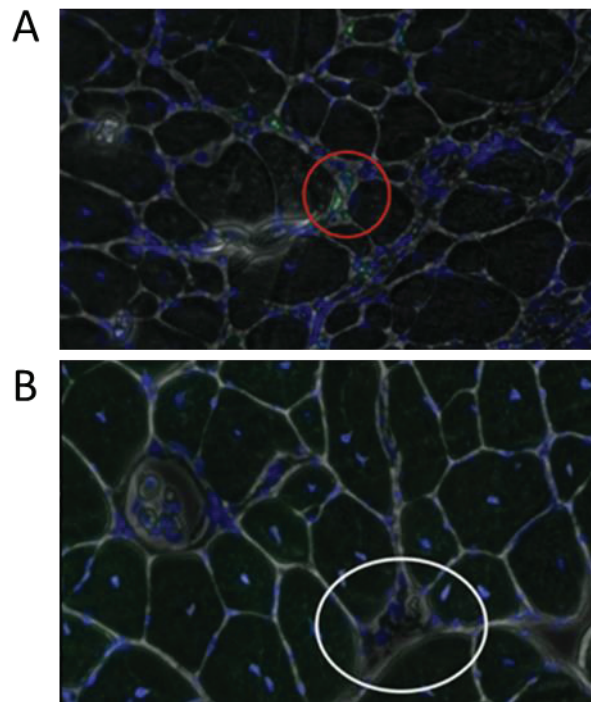


Figure 36 : Localisation d'ADAMTSL1 dans le muscle tibial antérieur. L'immunofluorescence d'ATL1 a été réalisée sur des coupes de muscle tibial antérieur sur une souris âgée de 8 semaines, sauvage (A) ou invalidée pour ADAMTSL1 (B). L'IF révèle une localisation d'ATL1 au niveau de l'endomysium du muscle squelettique (cercle rouge, marquage vert). La souris KO pour ATL1 ne présente aucun marquage. Les noyaux sont marqués au DAPI (bleu).

3.5. Implication d'ADAMTSL1 dans la voie du TGF β

Le TGF β est une cytokine jouant un rôle clé au cours du développement. Deux protéines ADAMTSL ont été impliquées dans la régulation de son activité, de par leur capacité à moduler sa biodisponibilité au niveau matriciel. En effet, à sa sortie du golgi, les dimères de TGF β sont rendus inactifs par liaison avec le peptide LAP (latency associated peptide) formant ainsi le Small Latent Complex (SLC) qui s'associe ensuite avec la protéine LTBP (latent TGF β binding protein) devenant alors le Large Latent Complex (LLC). Le LLC est sécrété de la cellule et peut se lier à la MEC par l'intermédiaire de la protéine LTBP ayant la capacité de s'associer aux microfibrilles par interaction avec la fibrillin-1 ([Figure 37](#)). L'activité ainsi que la biodisponibilité du TGF β sont ainsi contrôlées. Compte-tenu de l'implication des protéines ADAMTSL2 et ADAMTSL6 dans la signalisation du TGF β ,

favorisant sa séquestration en interagissant avec la fibrilline-1, nous avons émis l'hypothèse qu'ADAMTSL1 pourrait également jouer un rôle dans la voie du TGF β .

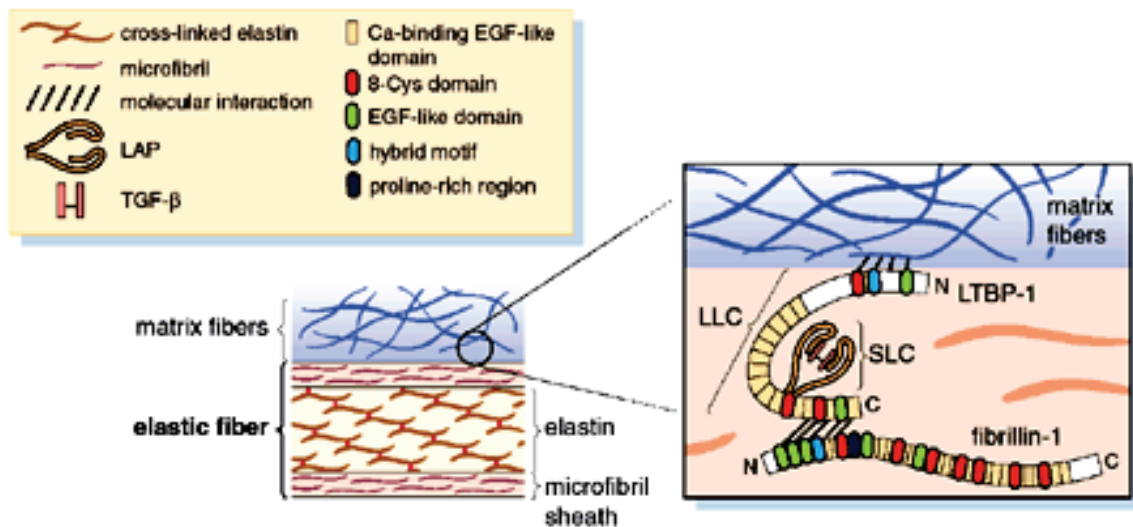


Figure 37 : Séquestration du TGF β dans la MEC (Kaartinen et Warburton, 2003). Le dimère de TGF β s'associe au peptide LAP pour former le SLC puis à LTPB-1 devenant ainsi le LLC qui va se lier à la fibrilline-1 dans la MEC.

Afin de vérifier cette question, nous avons comparé l'expression d'un gène activé par le TGF β , PAI1, dans les tissus musculaires (diaphragme, gastrocnémien) et cartilagineux (appendice xiphoïde et condyle) de souris sauvages et ADAMTSL1^{-/-} âgées de un an et issues de mêmes portées. Les souris ont été mises à mort puis les tissus prélevés cryobroyés avant d'extraire l'ARNm au Trizol. De manière très intéressante, nous avons observé que les tissus de muscle et de cartilage issus de souris invalidées pour ADAMTSL1 présentent un niveau d'expression de PAI1 plus élevé que les mêmes tissus issus de souris contrôles (**Figure 38**). Il semble donc y avoir une activation anormale de la voie du TGF β lorsque ATL1 n'est pas exprimé dans les tissus ce qui correspond bien à notre hypothèse. En effet, en absence d'ATL1, la séquestration du TGF β serait moins effective dans les tissus, favorisant ainsi une activation de cette voie de signalisation.

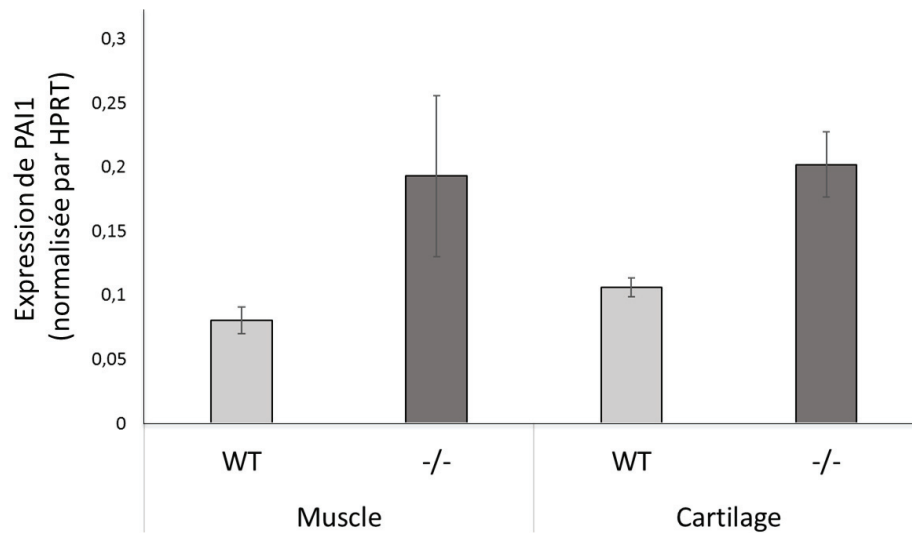


Figure 38 : Activation de la voie TGF β dans les tissus musculaires et cartilagineux des souris invalidées pour ADAMTSL1. L'expression du gène PAI1, cible de la voie TGF β a été quantifiée par RT-qPCR dans les tissus musculaires (n=5 ATL^{+/+}, n=6 ATL1^{-/-}) et cartilagineux (n=3 ATL1^{+/+}, n=3 ATL1^{-/-}). Résultats : moyenne +/- écart type.

DISCUSSION

Discussion

I. Partie 1 : Implication du couple nétrine-1/DCC dans la survenue de lymphomes à cellules B

1. La signalisation apoptotique de DCC : modalités, blocage et tumorigenèse

1.1. DCC, un suppresseur de tumeur conditionnel et ubiquitaire ?

DCC joue vraisemblablement un rôle de suppresseur de tumeur conditionnel, grâce à son activité apoptotique permettant de limiter la croissance tumorale et la dissémination métastatique en absence de nétrine-1. L'impact d'un blocage de sa fonction apoptotique dans le contrôle de la tumorigenèse colorectale a été démontré grâce aux souris DCC^{D1290N} , mutées sur son site de clivage pour les caspases (M. Castets et al. 2012). J'ai participé ici à montrer que DCC est également impliqué dans la lymphomagenèse (Broutier et al. 2016).

Comme mentionné précédemment, la perte d'expression de DCC a été décrite dans de nombreux types de cancers comme ceux de la vessie, de la prostate, du pancréas, ou encore les carcinomes du sein, les neuroblastomes et les glioblastomes. Les observations conjointes ouvrent le champ au fait que DCC pourrait jouer le rôle de suppresseur de tumeur dans de nombreux autres cancers. Les souris DCC^{D1290N} présentent uniquement des lymphomes au cours du vieillissement, mais il est possible que cela soit dû au fait que les souris C57BL/6 sont prédisposées à leur survenue (Frith, Ward, et Chandra 1993). Afin de définir l'impact de DCC dans d'autres cancers, il conviendrait sans doute de travailler dans des contextes génétiques prédisposant aux cancers de la vessie, de la prostate ou du pancréas par exemple. Il serait intéressant également d'observer l'effet du blocage de l'activité apoptotique de DCC dans le modèle prédisposé au cancer mammaire utilisé par Krimpenfort afin de voir si ce blocage peut être suffisant pour favoriser l'apparition de tumeurs. Cela paraît important car cette expérience permettrait de distinguer la part relative de la signalisation positive et négative sachant que, dans les souris DCC^{D1290N} , la signalisation positive est préservée, ce qui n'est pas le cas dans le modèle initial de Krimpenfort avec la perte totale de DCC (Krimpenfort et al. 2012).

En ce sens, la base de données Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer (COSMIC) recense comme son nom l'indique les mutations somatiques retrouvées dans différents types de cancers. L'analyse *in vitro* de l'impact des mutations de DCC retrouvées dans cette banque de données, sur la capacité de DCC à induire l'apoptose et la voie positive en réponse à la nétrine-1 permettrait de déterminer s'il existe chez l'Homme des situations où seule la signalisation apoptotique de DCC est bloquée et la voie positive toujours fonctionnelle.

1.2. Modalités de la signalisation apoptotique de DCC : vers l'identification de nouveaux acteurs de la tumorigenèse

On connaît relativement peu d'éléments sur la signalisation apoptotique induite par DCC. Elle est dépendante de la caspase 9 mais indépendante de la voie mitochondriale. DCC fonctionnerait donc sur le modèle des récepteurs de mort, c'est à dire sans intervention de la mitochondrie (pas de relargage du cytochrome c), ni de la protéine APAF1 mais en nécessitant par contre la caspase 9, impliquée dans la voie intrinsèque. DCC est capable d'interagir avec la caspase 3 et la caspase 9, qu'il peut ainsi activer mais on sait également que DCC a lui-même besoin d'être clivé par les caspases pour induire l'apoptose. On peut donc souligner le paradoxe de ce récepteur qui comme les autres RD a besoin d'être clivé par les caspases avant de les activer en retour. Il a été postulé qu'il existerait dans le cytoplasme un pool de caspases activées en permanence, pouvant ainsi cliver le RD une fois le site de clivage démasqué en absence de ligand. Le RD pourrait ensuite former une boucle d'amplification de l'activation des caspases. On sait que les récepteurs de mort une fois activés par leur ligand recrutent une plateforme d'activation des caspases comme le DISC ou le PIDDosome. Une telle plateforme n'a pas encore été décrite pour DCC, à l'exception de la protéine DIP13 alpha, qui a la capacité d'interagir avec le domaine cytoplasmique de DCC et qui, si elle est inhibée, bloque l'apoptose induite par DCC (Liu et al., 2002). Il est bien sur également fort probable que DCC interagissent avec d'autres protéines accessoires voir un ou des co-récepteurs permettant la formation d'un complexe apoptotique, de la même manière que le RD Patched interagit avec les protéines DRAL, TUCAN et la caspase 9 pour former le « dependosome » (Mille et al. 2009). La dissection de la voie apoptotique de DCC, actuellement en cours dans le laboratoire du Dr P. Mehlen, est importante à deux niveaux. D'un point de vue physiologique, si la signalisation pro-apoptotique de DCC semble être un élément important dans le contrôle de la tumorigenèse, il est possible qu'elle joue également un rôle dans d'autres fonctions de l'organisme, notamment dans le développement du système nerveux. D'autre part, identifier ces mécanismes de régulation est très important pour voir si d'autres moyens de blocage de l'apoptose induite par DCC peuvent être retrouvés dans les cancers. Il est possible que DIP13 alpha ou d'autres protéines interagissant avec DCC soient dérégulées dans les tumeurs et que ces altérations favorisent la survie des cellules tumorales. D'après la base de données COSMIC, on retrouve assez peu de mutations de DIP13 alpha dans les cancers mais son expression est parfois dérégulée, comme dans les cancers du rein, dans lesquels son expression est sous-exprimée dans 10% des cas. La pertinence de ces dérégulations par rapport à la signalisation de DCC doit être déterminée, puisqu'elles pourraient jouer un rôle dans la transformation tumorale dans un contexte où DCC est exprimé et fonctionnel.

1.3. DCC/nétrine-1 : nouvelles cibles dans la prise en charge des lymphomes à cellules B ?

Nous avons ici conclu à un rôle clé du couple DCC/nétrine-1 dans la survenue des lymphomes de types LDGC-B et lymphomes du manteau, avec un rôle oncogénique de la nétrine-1, surexprimée en particulier dans les lymphomes du manteau et dans les LDGC-B de type ABC qui sont les plus agressifs. Une TMA a été initiée afin de voir si l'expression du couple DCC/nétrine-1 est dérégulée dans d'autres types de lymphomes ou si, au contraire, cela reste un événement spécifique à certains sous-types histologiques. De plus, au sein d'un même sous-type, comme par exemple les LDGC-B de type ABC, on retrouve une disparité de l'expression de la nétrine-1 qui est globalement surexprimée mais pas dans 100% des cas.

Comment expliquer cette différence d'expression et quels sont les éléments qui peuvent induire une dérégulation de l'expression de la nétrine-1 dans un sous-type particulier plutôt qu'un autre ? On sait par exemple que la voie de signalisation de NFκB est fréquemment activée dans les LDGC-B et que la nétrine-1 est régulée positivement par la voie NFκB notamment dans les cancers colorectaux liés à l'inflammation (Espinosa et al. 2008; Paradisi et al. 2009). Nous avons observé qu'inhiber la voie NFκB dans la lignée Oci-Ly3 permet effectivement de diminuer l'expression de la nétrine-1. Cependant cette voie n'est probablement pas seule en cause de l'altération du niveau d'expression de la nétrine-1. Il conviendra donc de réaliser une analyse *in silico* du promoteur de la nétrine-1, afin de chercher des sites putatifs de facteur de transcription dérégulés dans les lymphomes et de corrélérer l'augmentation de l'expression de la nétrine-1 à des dérégulations potentielles d'autres voies de signalisation.

De la même façon que pour le ligand, nous avons observé une dérégulation de l'expression du récepteur DCC qui a une tendance à être perdu dans les lymphomes B de type GC. Le/les mécanismes à l'origine de cette sous-expression dans ce type de cancers restent encore inconnus. Il a été décrit dans d'autres types de cancers que DCC peut être invalidé par perte d'hétérozygotie ou hyperméthylation du promoteur (Nakayama, Inokuchi, et Dan 2005). Une analyse des mutations apparues dans les lymphomes à cellules B, recensées dans la base de données COSMIC, nous a permis de constater que DCC est muté seulement dans 8 LDGC-B sur 302 cas séquencés et on ne retrouve aucune mutation dans les lymphomes du manteau (41 cas étudiés). DCC ne semble donc pas altéré majoritairement dans les lymphomes du manteau et dans les LDGC-B par mutation. Il serait intéressant toutefois de regarder si les mutations somatiques retrouvées dans les LDGC-B peuvent affecter l'expression de DCC ou sa fonction apoptotique.

Sur un plan thérapeutique, l'idée est de restaurer la mort induite par DCC en ciblant la nétrine-1. La première étape sera donc de définir les patients éligibles à ce type de thérapie : existe-t-il un seuil de nétrine-1 à partir duquel la thérapie peut fonctionner ? Peut-on retrouver une signature moléculaire commune aux patients présentant un gain de nétrine-1 ? Des analyses complémentaires permettant de corrélérer l'expression de nétrine-1 à différents facteurs cliniques et à des données de transcriptomiques par

exemple seraient utiles pour répondre à ces questions. De plus, il est impossible d'affirmer que le gain de nétrine-1 soit un marqueur suffisant pour garantir l'efficacité du traitement. En effet, il est nécessaire de vérifier la fonctionnalité de la voie apoptotique afin de pouvoir induire la mort cellulaire. Il semble également important de vérifier la corrélation entre expression anormale de nétrine-1 et résistance aux traitements afin de pouvoir éventuellement développer une stratégie thérapeutique visant à combiner les traitements classiques de chimio ou immunothérapie à l'anticorps ciblant la nétrine-1. Cela pourrait permettre d'induire une synergie entre les traitements et éventuellement de diminuer les doses d'agents toxiques à lourds effets secondaires, le but ultime étant de tendre vers des traitements spécialisées et adaptés à chaque patient. La réexpression du récepteur par thérapie génique pourrait également constituer une piste différente à plus long terme dans les cas présentant une perte de DCC mais pas de gain de nétrine-1, afin d'induire une apoptose massive dans les cellules tumorales.

1.4. Place du couple DCC/nétrine-1 dans les lymphomes extra-nodaux

Nous avons observé que les lymphomes extra-nodaux présentent une forte expression du récepteur DCC mais pas de son ligand nétrine-1, dont l'expression semble restreinte à l'environnement tumoral. Nous avons essayé, sans succès, de démontrer dans un modèle murin le rôle indispensable de la nétrine-1 dans la survenue, la localisation et la persistance de ces lymphomes.

Beaucoup de questions restent en suspens quant à l'implication de la nétrine-1 et de DCC dans les lymphomes extra-nodaux :

- Il y a tout d'abord une nécessité de trouver des solutions à l'échec de la mise en place de lymphomes extra-nodaux murins, peut être en changeant la lignée cellulaire utilisée ou le fond génétique des souris greffées, afin d'être dans une souche identique à celle décrite dans le papier dans lequel les 38C13 sont greffées en intraveineuse. En effet, les auteurs ont utilisé la souche C3H/HeN, alors que nous nous sommes servis de souris de fond C57BL/6. Ce sont cependant deux fonds génétiques de souris immunocompétentes et fréquemment utilisées pour des expériences de tumorigenèse (Bryson et al. 1999). Il est cependant possible que les cellules 38C13 provenant du fond C3H/HeN soient rejetées plus rapidement par nos souris C57BL/6.

Une autre solution pour développer un modèle murin de PCNSL pourrait être de modifier la stratégie de greffe, en utilisant par exemple une greffe intracardiaque. Ce type de greffe dans le ventricule gauche permet aux cellules greffées d'avoir un accès plus direct au cerveau et favoriser ainsi l'obtention de tumeurs cérébrales. Cela serait un bon modèle à utiliser dans des souris soit invalidées pour la nétrine-1 (de façon inductible après l'âge adulte puisque le knock-out est létal), soit surexprimant la nétrine-1, afin de quantifier l'incidence et le volume des tumeurs dans le but de vérifier si la nétrine-1 peut être un facteur trophique favorisant la survenue des PCNSL. Nous avons également envisagé d'avoir recours à une greffe stéréotaxique afin d'implanter les cellules tumorales

directement dans le cerveau de nos souris d'intérêt. Les cellules tumorales se retrouvent ainsi directement implantées dans un endroit favorable à leur croissance et n'ont ainsi pas à franchir la barrière hémato-encéphalique. Cela pourrait permettre de développer un modèle de PCNSL et ainsi de tester le rôle de la nétrine-1 sur le homing de ces tumeurs.

- Au niveau chromosomique, il a été montré que les PCNSL présentent un gain de la région 18q21 qui contient notamment le locus de DCC (Richter et al. 2009), ce qui est relativement rare puisque, comme nous l'avons décrit précédemment, cette région est perdue dans de nombreux types de cancers. Il sera important de définir si la persistance de DCC est associée à la fonctionnalité de la voie apoptotique aval, validant de fait la nécessité pour les cellules de disposer de nétrine-1 dans leur environnement. L'analyse conduite sur les 800 cas de PCNSL a mis en avant 6 mutations de DCC. Il a été décrit pour UNC5C qu'une mutation retrouvée dans les cancers colorectaux d'origine familiaux mène à l'extinction de la signalisation apoptotique conférant ainsi aux cellules tumorales un avantage sélectif (Coissieux et al. 2011). Il est possible qu'une, plusieurs ou chacune des 6 mutations de DCC dans les PCNSL permettent d'échapper à l'apoptose induite par DCC favorisant ainsi la survie des cellules tumorales. Cette hypothèse devra être testée *in vitro*, en évaluant la capacité de mutants de DCC à induire l'apoptose dans des expériences de surexpression transitoire par exemple.

- Enfin, l'analyse de la cohorte en cours de désarchivage au Centre Léon Bérard devrait nous permettre de confirmer les résultats préliminaires obtenus selon lesquels les cellules tumorales de lymphomes extra-nodaux expriment le récepteur DCC, mais pas son ligand, que l'on retrouve par contre dans l'environnement péri-tumoral. L'hypothèse sous-jacente est que la nétrine-1 dans l'environnement pourrait permettre soit le développement de ces tumeurs en « attirant » les cellules exprimant DCC qui ont besoin de leur ligand pour survivre, soit favoriser leur croissance en empêchant le récepteur d'activer son programme de mort cellulaire. La persistance de DCC dans ces lymphomes pourrait dans ce cas induire une dépendance à la nétrine-1 liée à la voie positive. Il y a donc deux possibilités : 1) la nétrine-1 est nécessaire pour la survie des lymphomes en bloquant l'apoptose induite par DCC ou 2) le couple DCC/nétrine-1 est nécessaire aux cellules de lymphomes *via* la voie positive, en induisant par exemple leur migration.

Il conviendra aussi de définir si ce mécanisme dans lequel le récepteur est exprimé par la tumeur et le ligand par son environnement est généralisé aux lymphomes extra-nodaux ou bien restreint à une fraction de patients, qu'il faudra le cas échéant identifier et caractériser. Si la surexpression de nétrine-1 par l'environnement n'est pas nécessaire à la survenue de lymphomes extra-nodaux, il sera important de définir sa valeur pronostique. Il faudra également déterminer quelles sont les cellules qui produisent la nétrine-1 afin de préciser s'il s'agit d'un événement réactionnel, et donc postérieur à l'installation des cellules tumorales, ou au contraire intrinsèque à ces organes.

La compréhension du tropisme des lymphomes extra-nodaux est un élément capital puisque, malgré leur absence de dissémination, ils restent une catégorie agressive de cancer avec un taux de survie moyen de 19 mois chez les patients traités (chimio/radiothérapie). En fonction des résultats obtenus sur le rôle du couple DCC/nétrine-1 dans leur étiologie, nous pourrions envisager le développement d'une thérapie ciblée visant à

empêcher l'association de ce ligand à son récepteur, afin d'induire la mort des cellules tumorales. Le cerveau étant tenu à l'écart du système immunitaire par la barrière hémato-encéphalique, l'utilisation d'un anticorps bloquant l'interaction entre DCC et la nétrine-1 n'est peut-être pas la meilleure option et il faudra éventuellement envisager une autre stratégie d'interférence.

II. Partie 2 : Caractérisation fonctionnelle d'ADAMTSL1, partenaire potentiel de DCC

1. DCC et ADAMTSL1/3, faut-il vraiment abandonner cette piste ?

L'étude conduite chez *C. elegans* avait démontré une interaction fonctionnelle entre UNC-40 et MADD-4 d'une part, UNC-40 et UNC-6 d'autre part (Seetharaman et al. 2011). En raison de biais expérimentaux, nous n'avons pas pu prouver ici l'existence d'un lien entre ces protéines chez les Vertébrés. Cependant les résultats d'IP suggèrent qu'ils puissent exister une interaction entre DCC et ADAMTSL1. Ces résultats doivent être confirmés sur des protéines endogènes pour être validés, sur des lysats cellulaires et/ou des tissus de souris sauvages ou ATL1^{-/-}, de manière à valider la spécificité des résultats obtenus. Il conviendra également de déterminer si ATL1 interagit avec les autres récepteurs à la nétrine-1. L'ajout d'un récepteur sans lien avec la nétrine-1, comme Ptc et TNFR1 par exemple, sera également nécessaire comme contrôle négatif de ces expériences. La technique de Duolink (Sigma), qui est un test de proximité de ligation dans lequel les anticorps secondaires sont couplés à une sonde PLUS et une sonde MOINS émettant un signal uniquement lorsque les deux protéines étudiées sont très proches physiquement, serait également une technique complémentaire pour i) tester cette interaction et ii) savoir où a lieu l'interaction au niveau tissulaire et cellulaire. Il est d'ailleurs important de mentionner que la réalisation de ces tests sur des systèmes cellulaires en 2D peuvent donner lieu à des biais de manipulation puisqu'ATL1 est matricielle, d'où l'intérêt de travailler sur le modèle murin ou de mettre en place des cultures 3D (cf paragraphe suivant).

Sur le plan fonctionnel, si les résultats obtenus suggéraient qu'ATL1 puisse moduler l'activité apoptotique de DCC, un biais lié à l'induction inexplicée de DCC, y compris endogène, par notre plasmide contrôle nous empêche de conclure sur l'existence d'une telle modulation de DCC par ATL1. Pour des raisons stratégiques liées à la nécessité alors de focaliser ma thèse sur un sujet particulier, nous avons choisi de ne pas poursuivre cet axe de recherche. Cependant, plusieurs dispositifs expérimentaux auraient pu être mis en place pour tester les liens entre DCC et ATL1. En premier lieu, il conviendrait de travailler *in vitro* dans un système 3D permettant de mieux reproduire les interactions ayant lieu entre les récepteurs membranaires et les protéines matricielles. L'effet que peut avoir ATL1 sur les tissus, que ce soit au niveau de la survie, de la prolifération, de la migration ou autre est difficile à déterminer *in vitro* puisqu'il faut mettre en place un système où les cellules sont en présence de MEC. Un modèle de culture cellulaire classique en 2D dans

lequel les cellules sont cultivées isolément n'est pas idéal pour modéliser l'effet d'ATL1 sur la MEC. Cette stratégie de culture 3D est actuellement en cours de mise en place pour les cellules de chondrosarcomes, pour lesquelles nous essayons de mettre en place un système de culture de culots cellulaires intriqués dans différentes matrices artificielles, notamment à base d'alginate.

Ensuite, et pour pallier aux biais expérimentaux constatés, il conviendrait de créer des lignées stables inductibles permettant de moduler l'expression d'ATL1. Nous disposons ainsi au laboratoire d'un plasmide dans lequel peuvent être introduits soit un ShARN soit un ADNc dont le promoteur est sous le contrôle de la doxycycline. De cette manière, le transgène ou le ShARN ne sont exprimés qu'en présence de cette molécule et peuvent être induits de manière contrôlée.

Enfin, il conviendrait également de tester l'impact d'ADAMTSL3, l'autre orthologue de MADD-4, sur la signalisation induite par DCC et ce d'autant plus que le patron d'expression d'ATL3, exprimé dans le cerveau et l'intestin, se superpose mieux à celui de DCC qu'ATL1, qui est plutôt exprimé dans le cartilage et le muscle ([Figure 39](#)). Nous avons donc réorienté le projet sur le rôle d'ATL1 dans ces tissus pour la suite.

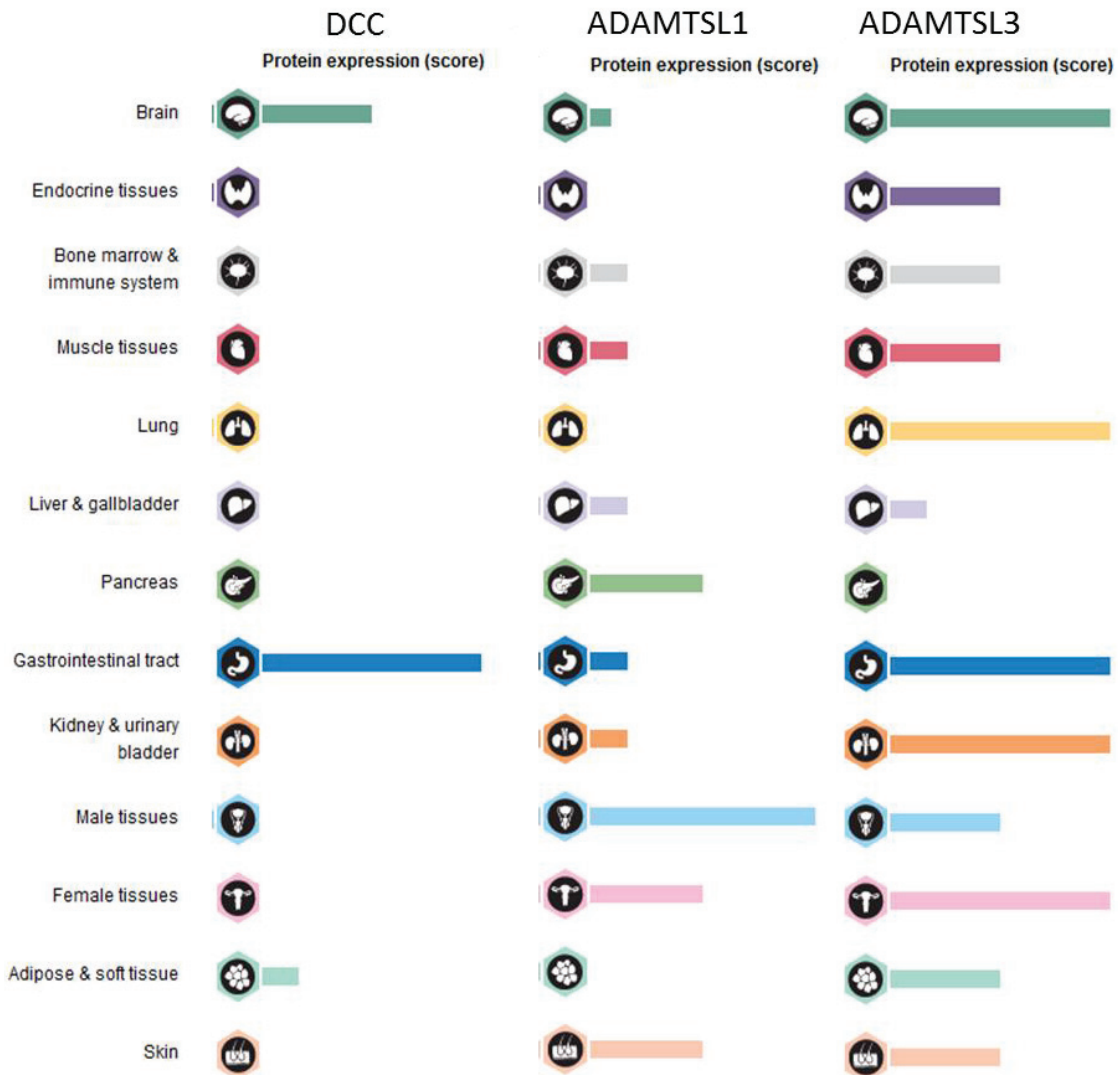


Figure 39 : Expression protéique de DCC, ADAMTSL1 et ADAMTSL3 (d'après The Human Atlas Protein). L'expression des protéines est détectée en IHC sur des coupes de tissus issues de différents types d'organes. DCC présente une expression élevée dans le cerveau et le tractus gastro-intestinal alors que l'expression d'ATL1 et ATL3 est plus variée avec une expression plus forte d'ATL1 au niveau des organes génitaux masculins et féminins ainsi que du pancréas. Comme DCC, on retrouve ATL3 fortement exprimée dans le cerveau et le tractus gastro-intestinal ainsi que dans les poumons, les reins et le système urinaire.

2. Implication d'ADAMTSL1 dans les tissus musculaires et cartilagineux

2.1. ATL1 est-elle impliquée dans la régénération musculaire ?

D'après la publication de Hirohata et al., ADAMTSL1 est exprimé spécifiquement dans le muscle squelettique (Hirohata et al. 2002). Nous avons en effet observé dans les souris sauvages analysées une forte expression dans les tissus musculaires analysés. Nous

n'avons observé aucun défaut musculaire basal chez les souris *ATL1*^{-/-}, ce qui est fréquent puisque chez les souris le processus de régénération est plus efficace que chez l'Homme. Il arrive en effet que des souris invalidées pour des gènes impliqués dans la régénération ou la physiologie du muscle ne présentent aucun défaut musculaire (P. Castets et al. 2012). Afin de déterminer si cette protéine peut avoir un rôle physiologique dans le muscle, nous avons utilisé un modèle classique de régénération et induit une nécrose musculaire par la cardiotoxine dans les souris invalidées pour *ADAMTSL1*.

On peut diviser les phases de la régénération musculaire en 5 étapes successives : la nécrose, l'inflammation, la régénération, le remodelage matriciel et la maturation. La phase nécrotique suivant chaque lésion musculaire est caractérisée par une perte d'intégrité du sarcolemme, un influx d'ions Ca^{2+} , ainsi qu'un déversement du matériel contractile. Elle stimule également la phase inflammatoire qui va suivre, en favorisant le recrutement des neutrophiles, qui vont à leur tour sécréter des cytokines pro-inflammatoires attirant sur le site de la blessure des monocytes et macrophages. Les macrophages sont majoritaires et détectables dans le péri- et l'épimysium où, ils évacuent les débris et activent les cellules souches satellites. Un équilibre fin se met en place entre les macrophages M1 pro-inflammatoires et les M2 anti-inflammatoires, capables de désactiver les premiers. La régénération musculaire est assurée par les cellules souches appelées cellules satellites, cellules en temps normal quiescentes situées entre la lame basale et le sarcolemme. Ces cellules peuvent donc en cas d'activation fusionner avec les myofibres existantes ou fusionner entre elles afin de former de nouvelles fibres musculaires. La phase de régénération passe également par un stade d'activation de la MEC, pendant lequel on retrouve une surproduction de collagène, fibronectine, élastine et PG permettant ainsi de stabiliser et supporter les nouvelles fibres. Le $TGF\beta$ a été identifié comme étant un acteur clé de ce processus fibrotique, favorisant la synthèse des molécules de la MEC d'un côté et inhibant leur dégradation de l'autre (Musaro et al. 2014).

Les résultats que nous avons obtenus sur 4 portées différentes montrent que les souris invalidées pour *ATL1* présentent 28 jours après injection de CTX, des défauts de régénération musculaire possibles caractérisés par la présence de gouttelettes lipidiques. La présence d'adipocytes dans le muscle squelettique est fréquente dans les pathologies où l'intégrité musculaire est fragilisée comme les myopathies, l'obésité ou encore le diabète de type II (Uezumi et al. 2010; Joe et al. 2010). Dans le cas de la dystrophie de Duchenne, il arrive que le muscle entier soit remplacé par des adipocytes dans les stades avancés. Cependant, l'origine de ces adipocytes ainsi que les stimuli à l'origine de leur formation restent inconnus. Il paraît donc important de déterminer à quel moment *ATL1* peut intervenir dans ce processus régénératif. Il faudra préciser l'existence d'éventuelles autres altérations. En particulier, des marquages *Pax7*/laminine permettront de vérifier l'intégrité du contingent de cellules satellites dans les souris *ATL1*^{-/-}. De plus, un défaut musculaire chez les souris *ATL1*^{-/-} pourrait expliquer l'asymétrie costale que nous avons observé chez ces souris. Si ces résultats suggèrent qu'*ATL1* soit impliquée dans la régénération musculaire, son mode d'action reste inconnu. Sur le plan histologique, les

tissus de souris KO pour ATL1 présentent une surexpression du gène PAI, cible du TGF β (Ueno et al. 2011). Il pourrait donc y avoir dans ces souris, sur le plan moléculaire, une activation excessive de cette voie de signalisation en absence de ATL1. Si ces résultats doivent absolument être confirmés en étudiant d'avantage d'animaux à différents âges et stades de développement, et en analysant le profil d'expression d'autres gènes cibles du TGF β , la première hypothèse est que, sur le plan moléculaire, ATL1 puisse moduler la voie du TGF β tout comme ATL2 et ATL6. Dans le cas d'ATL2 et ATL6, la modulation de la voie du TGF β se joue au niveau de la séquestration de cette cytokine. Ces deux protéines interagissent en effet avec la fibrilline et la protéine LTPB-1, protéines matricielles, formant ainsi un complexe qui favorise la séquestration dans la MEC du TGF β . En cas de mauvaise séquestration, le TGF β est relâché dans la MEC et peut alors activer ses récepteurs et induire différentes cascades de signalisation. Il semble donc indispensable maintenant d'étudier l'interaction entre ATL1 et les protéines de séquestration du TGF β pour voir si son influence sur cette voie de signalisation se joue sur ce mécanisme. Pour cela, il faudrait dans un premier temps voir si ADAMTSL1 peut interagir avec la protéine LTBP comme ATL2 et ATL6 et également observer son rôle sur la biogenèse des microfibrilles comme cela a déjà été réalisée pour ces deux protéines (Le Goff et al. 2008; Saito et al. 2011).

Vu le rôle de MADD-4 dans la mise en place des jonctions neuromusculaires et son implication dans l'organisation des récepteurs au GABA au niveau des synapses, on peut également émettre l'hypothèse d'une fonction d'ATL1 dans l'organisation de la jonction neuromusculaire chez les mammifères (Tu et al. 2015). Il serait intéressant dans un premier temps d'observer l'organisation des récepteurs au GABA dans les souris invalidées pour ATL1.

2.2. ATL1, régulateur de la mise en place/ du remodelage du cartilage ?

Différentes protéines de la famille des ADAMTS ont été décrites pour leur implication dans l'ostéoarthrite, pathologie caractérisée par une perte de cartilage articulaire. ADAMTS4 et ADAMTS5 participent notamment activement à la dégradation des agrécanes matriciels dans ce type de syndrome (Shiraishi et al. 2016). Dans le cas d'ADAMTSL1, il a été montré que cette protéine possède la capacité de réguler positivement la prolifération de cellules de chondrosarcomes (Campbell et al. 2014). Cela n'a cependant pas été montré sur des cellules non tumorales de type chondrocytes. Les souris invalidées pour ADAMTSL1 ne présentent pas de défauts majeurs du cartilage visibles basalement, en dehors d'un possible défaut au niveau des processus transversaux et d'une prolifération moindre observée dans les plaques de croissance des animaux KO par rapport aux animaux sauvages. Cependant le nombre d'animaux analysés n'est pas assez important pour que le résultat soit considéré comme significatif. Ils devront donc être confirmés par augmentation de la taille de la cohorte. Comme dans le muscle, l'effet d'ADAMTSL1 pourra aussi être étudié dans un modèle de régénération comme celui

d'ostéoarthrite induite chirurgicalement dans articulations de souris (Fang et Beier 2014).

2.3. ATL1, signalisation et transcrits

a) ATL1 : différents transcrits, différentes fonctions ?

L'étude du patron d'expression d'ATL1 en fonction de l'âge et du sexe nous a révélé que plusieurs transcrits d'ATL1 pourraient être exprimés spécifiquement en fonction de l'âge et des organes. La forme « longue » qui contient l'exon 24 semble en effet exprimée spécifiquement au niveau des tissus génitaux pouvant indiquer un rôle spécifique de cette isoforme dans ces tissus. La forme contenant l'exon 3-4 est quant à elle fortement exprimée dans les tissus plutôt musculaire et cartilagineux, ainsi que dans les poumons. Il est donc possible qu'une isoforme dite « courte » joue un rôle dans la MEC de ces tissus, la longue pouvant jouer un rôle alternatif. Afin d'avoir une idée plus nette de la composition exacte de ces isoformes, il paraît judicieux de faire séquencer précisément ATL1 dans plusieurs organes à différents âges. Cela permettrait ensuite de pouvoir cloner les isoformes précis dans le but de faire des tests fonctionnels *in vitro*, en comparant systématiquement les résultats obtenus dans les deux cas.

b) Contrôle de l'expression d'ATL1

Il a été montré que la voie de signalisation Shh peut contrôler l'expression de ATL1 dans les cellules de chondrosarcomes (Campbell et al. 2014). Nous avons observé que son promoteur contient un site de fixation putatif pour SMAD4. Il serait donc intéressant d'étudier l'effet de la voie du TGF β sur l'expression d'ATL1 en étudiant notamment la capacité des protéines SMAD à se fixer au promoteur d'ATL1 par CHIP ou *via* des tests de type rapporteur luciférase, dans lequel l'expression de cette protéine serait placée sous contrôle du promoteur d'ATL1. Il sera aussi intéressant d'analyser les mécanismes pouvant contrôler l'expression d'ATL1 au niveau du muscle squelettique et de comprendre les modalités de coopération entre les voies Shh et TGF β dans la régulation de l'expression d'ATL1. Il est également possible que les transcrits d'ATL1 soient contrôlés par des facteurs de transcription différents expliquant la disparité de leur expression dans les tissus.

3. Implication d'ADAMTSL1 dans la tumorigénèse

L'expression d'ATL1 dans les cancers est à l'heure actuelle assez peu décrite. Nous avons pu montrer dans une cohorte de 14 cas de carcinomes colorectaux que l'expression d'ATL1 est fortement diminuée dans ces cancers, ce qu'il conviendra de préciser sur une

cohorte de plus grande taille afin i) de valider ce résultat et ii) de définir la valeur pronostique éventuelle de cette perte d'expression.

Plusieurs pistes sont à envisager afin de définir l'impact d'ATL1 sur la tumorigenèse :

- Cette protéine pourrait être impliquée dans d'autres types de cancers comme les rhabdomyosarcomes (RMS). Les RMS sont un cancer des tissus mous représentant 5% des cancers pédiatriques. Ils surviennent le plus souvent au niveau de la tête et du cou mais peuvent parfois toucher le tronc ou les membres. Ils sont divisés en deux sous-types, embryonnaires (75%) et alvéolaires (25%) en fonction de leurs caractéristiques histologiques (Sabnis et al. 2016). Ce type de cancer dérive du lignage musculaire. Les tumeurs sont caractérisées par la présence de cellules striées présentant des marqueurs musculaires. Il est possible qu'ATL1 joue un rôle dans le tissu musculaire. Son impact sur les RMS sera donc intéressant à définir en analysant en premier lieu son expression dans une cohorte de patients.
- Il est également possible que son mode d'action soit différent en fonction des organes. Il a été montré qu'ADAMTSL1 joue un rôle positif dans la prolifération de cellules de chondrosarcomes. Nous sommes en train de désarchiver au Centre Léon Bérard une cohorte de chondrosarcomes afin d'étudier l'expression d'ATL1 et voir si celle-ci est altérée au niveau basal dans ces cancers. Dans le cas des cancers du côlon, l'expression d'ATL1 comme celle d'ATL3 est fortement diminuée par rapport aux échantillons non tumoraux. Il semblerait donc qu'ATL1 puisse jouer plutôt un rôle suppresseur de tumeur, ce qui peut paraître antagoniste avec les résultats obtenus dans les chondrosarcomes dans lesquels ATL1 semblent favoriser la prolifération. Il sera donc important de tester le rôle d'ATL1 sur la prolifération, la migration, la survie et plus généralement sur les capacités tumorigènes des cellules en culture 3D ou *in vivo*.

Conclusion générale

Le travail réalisé au cours de ma thèse a tout d'abord permis d'apporter un nouvel éclairage sur la fonction de DCC en tant que suppresseur de tumeur chez l'Homme. Nous avons en effet pu montrer que l'expression du couple DCC/nétrine-1 est dérégulée dans les lymphomes à cellules B et qu'interférer entre le récepteur et son ligand peut constituer une stratégie thérapeutique envisageable. De plus, nous avons soulevé une question innovante quant à l'implication éventuelle de ce couple dans la survenue des lymphomes extra-nodaux, ce qui pourrait pour la première fois permettre d'expliquer leur tropisme si particulier.

Enfin, nous avons commencé à dérouler le fil des connaissances sur la fonction d'ADAMTSL1 chez les Mammifères. En effet, il semblerait que cette protéine soit nécessaire à la régénération musculaire. Il est possible que cette fonction passe par la régulation de la voie de signalisation du TGF β comme d'autres ADAMTSL. Ces pistes doivent être poursuivies de manière à définir le rôle putatif de cette protéine dans différents processus pathologiques, qu'ils soient dégénératifs ou tumoraux.

BIBLIOGRAPHIE

- Alizadeh, A. A., M. B. Eisen, R. E. Davis, C. Ma, I. S. Lossos, A. Rosenwald, J. C. Boldrick, et al. 2000. « Distinct Types of Diffuse Large B-Cell Lymphoma Identified by Gene Expression Profiling ». *Nature* 403 (6769): 503-11. doi:10.1038/35000501.
- Amaravadi, Ravi K., Duonan Yu, Julian J. Lum, Thi Bui, Maria A. Christophorou, Gerard I. Evan, Andrei Thomas-Tikhonenko, et Craig B. Thompson. 2007. « Autophagy Inhibition Enhances Therapy-Induced Apoptosis in a Myc-Induced Model of Lymphoma ». *The Journal of Clinical Investigation* 117 (2): 326-36. doi:10.1172/JCI28833.
- Anthony, I. C., D. H. Crawford, et J. E. Bell. 2003. « B Lymphocytes in the Normal Brain: Contrasts with HIV-associated Lymphoid Infiltrates and Lymphomas ». *Brain* 126 (5): 1058-67. doi:10.1093/brain/awg118.
- Antoine-Bertrand, Judith, Min Fu, et Nathalie Lamarche-Vane. 2016. « Direct Measurement of Oscillatory RhoA Activity in Embryonic Cortical Neurons Stimulated with the Axon Guidance Cue Netrin-1 Using Fluorescence Resonance Energy Transfer ». *Biology of the Cell / Under the Auspices of the European Cell Biology Organization* 108 (5): 115-26. doi:10.1111/boc.201500077.
- Aoto, Jason, et Lu Chen. 2007. « Bidirectional Ephrin/Eph Signaling in Synaptic Functions ». *Brain Research* 1184 (décembre): 72-80. doi:10.1016/j.brainres.2006.11.033.
- Ashida, Hiroshi, Michinaga Ogawa, Minsoo Kim, Hitomi Mimuro, et Chihiro Sasakawa. 2012. « Bacteria and Host Interactions in the Gut Epithelial Barrier ». *Nature Chemical Biology* 8 (1): 36-45. doi:10.1038/nchembio.741.
- Ashkenazi, A., et V. M. Dixit. 1998. « Death Receptors: Signaling and Modulation ». *Science (New York, N.Y.)* 281 (5381): 1305-8.
- Basso, Katia, et Riccardo Dalla-Favera. 2010. « BCL6: Master Regulator of the Germinal Center Reaction and Key Oncogene in B Cell Lymphomagenesis ». *Advances in Immunology* 105: 193-210. doi:10.1016/S0065-2776(10)05007-8.
- . 2015. « Germinal Centres and B Cell Lymphomagenesis ». *Nature Reviews. Immunology* 15 (3): 172-84. doi:10.1038/nri3814.
- Bergman, Y., et J. Haimovich. 1977. « Characterization of a Carcinogen-Induced Murine B Lymphocyte Cell Line of C3H/eB Origin ». *European Journal of Immunology* 7 (7): 413-17. doi:10.1002/eji.1830070702.
- Booman, M., K. Szuhai, A. Rosenwald, E. Hartmann, Hc Kluin-Nelemans, D. de Jong, E. Schuurin, et Pm Kluin. 2008. « Genomic Alterations and Gene Expression in Primary Diffuse Large B-Cell Lymphomas of Immune-Privileged Sites: The Importance of Apoptosis and Immunomodulatory Pathways ». *The Journal of Pathology* 216 (2): 209-17. doi:10.1002/path.2399.
- Broutier, Laura, Marion Creveaux, Jonathan Vial, Antonin Tortereau, Jean-Guy Delcros, Guillaume Chazot, Mark J. McCarron, et al. 2016. « Targeting Netrin-1/DCC Interaction in Diffuse Large B-Cell and Mantle Cell Lymphomas ». *EMBO Molecular Medicine* 8 (2): 96-104. doi:10.15252/emmm.201505480.
- Bryson, J. S., C. D. Jennings, D. M. Lowery, S. L. Carlson, D. L. Pflugh, B. E. Caywood, et A. M. Kaplan. 1999. « Rejection of an MHC Class II Negative Tumor Following Induction of Murine Syngeneic Graft-versus-Host Disease ». *Bone Marrow Transplantation* 23 (4): 363-72. doi:10.1038/sj.bmt.1701557.
- Cal, Santiago, et Carlos López-Otín. 2015. « ADAMTS Proteases and Cancer ». *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology* 44-46 (juillet): 77-85. doi:10.1016/j.matbio.2015.01.013.

- Campbell, Veronica T., Puvindran Nadesan, S. Amanda Ali, Chang Ye Yale Wang, Heather Whetstone, Raymond Poon, Qingxia Wei, et al. 2014. « Hedgehog Pathway Inhibition in Chondrosarcoma Using the Smoothed Inhibitor IPI-926 Directly Inhibits Sarcoma Cell Growth ». *Molecular Cancer Therapeutics* 13 (5): 1259-69. doi:10.1158/1535-7163.MCT-13-0731.
- Castets, Marie, Laura Broutier, Yann Molin, Marie Brevet, Guillaume Chazot, Nicolas Gadot, Armelle Paquet, et al. 2012. « DCC Constrains Tumour Progression via Its Dependence Receptor Activity ». *Nature* 482 (7386): 534-37. doi:10.1038/nature10708.
- Castets, Perrine, Alain Lescure, Pascale Guicheney, et Valérie Allamand. 2012. « Selenoprotein N in Skeletal Muscle: From Diseases to Function ». *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)* 90 (10): 1095-1107. doi:10.1007/s00109-012-0896-x.
- Chamberlain, Marc C., et Sandra K. Johnston. 2010. « High-Dose Methotrexate and Rituximab with Deferred Radiotherapy for Newly Diagnosed Primary B-Cell CNS Lymphoma ». *Neuro-Oncology* 12 (7): 736-44. doi:10.1093/neuonc/noq011.
- Chan, S. S., H. Zheng, M. W. Su, R. Wilk, M. T. Killeen, E. M. Hedgecock, et J. G. Culotti. 1996. « UNC-40, a C. Elegans Homolog of DCC (Deleted in Colorectal Cancer), Is Required in Motile Cells Responding to UNC-6 Netrin Cues ». *Cell* 87 (2): 187-95.
- Chargé, Sophie B. P., et Michael A. Rudnicki. 2004. « Cellular and Molecular Regulation of Muscle Regeneration ». *Physiological Reviews* 84 (1): 209-38. doi:10.1152/physrev.00019.2003.
- Chatenoud, et Bach. 2012. *Immunologie*. 6e éd. Lavoisier.
- Chautan, M., G. Chazal, F. Cecconi, P. Gruss, et P. Golstein. 1999. « Interdigital Cell Death Can Occur through a Necrotic and Caspase-Independent Pathway ». *Current Biology: CB* 9 (17): 967-70.
- Cheah, Chan Yoon, John F. Seymour, et Michael L. Wang. 2016. « Mantle Cell Lymphoma ». *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 34 (11): 1256-69. doi:10.1200/JCO.2015.63.5904.
- Chen, Faye H., Kathleen T. Rousche, et Rocky S. Tuan. 2006. « Technology Insight: Adult Stem Cells in Cartilage Regeneration and Tissue Engineering ». *Nature Reviews Rheumatology* 2 (7): 373-82. doi:10.1038/ncprheum0216.
- Chen, Robert, James Sanchez, et Steven T. Rosen. 2016. « Clinical Management Updates in Mantle Cell Lymphoma ». *Oncology (Williston Park, N.Y.)* 30 (4): 353-60.
- Choi, Gigi C. G., Jisheng Li, Yajun Wang, Lili Li, Lan Zhong, Brigitte Ma, Xianwei Su, et al. 2014. « The Metalloprotease ADAMTS8 Displays Antitumor Properties through Antagonizing EGFR-MEK-ERK Signaling and Is Silenced in Carcinomas by CpG Methylation ». *Molecular Cancer Research: MCR* 12 (2): 228-38. doi:10.1158/1541-7786.MCR-13-0195.
- Clarke, P. G. 1990. « Developmental Cell Death: Morphological Diversity and Multiple Mechanisms ». *Anatomy and Embryology* 181 (3): 195-213.
- Clarke, P. G., et S. Clarke. 1996. « Nineteenth Century Research on Naturally Occurring Cell Death and Related Phenomena ». *Anatomy and Embryology* 193 (2): 81-99.
- Coissieux, Marie-May, Jerneja Tomsic, Marie Castets, Heather Hampel, Sari Tuupanen, Nadine Andrieu, Ilene Comeras, et al. 2011. « Variants in the Netrin-1 Receptor UNC5C Prevent Apoptosis and Increase Risk of Familial Colorectal Cancer ». *Gastroenterology* 141 (6): 2039-46. doi:10.1053/j.gastro.2011.08.041.
- Collin, Gayle B., Dirk Hubmacher, Jeremy R. Charette, Wanda L. Hicks, Lisa Stone, Minzhong Yu, Jürgen K. Naggert, et al. 2015. « Disruption of Murine Adamtsl4

- Results in Zonular Fiber Detachment from the Lens and in Retinal Pigment Epithelium Dedifferentiation ». *Human Molecular Genetics* 24 (24): 6958-74. doi:10.1093/hmg/ddv399.
- Cox, Thomas R., et Janine T. Erler. 2011. « Remodeling and homeostasis of the extracellular matrix: implications for fibrotic diseases and cancer ». *Disease Models & Mechanisms* 4 (2): 165-78. doi:10.1242/dmm.004077.
- Cramer, Karina S., et Ilona J. Miko. 2016. « Eph-Ephrin Signaling in Nervous System Development ». *F1000Research* 5. doi:10.12688/f1000research.7417.1.
- Cuatrecasas, Pedro. 1972. « Isolation of the Insulin Receptor of Liver and Fat-Cell Membranes ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 69 (2): 318-22.
- Datta, Sandeep Robert, Ann M. Ranger, Michael Z. Lin, James Fitzhugh Sturgill, Yong-Chao Ma, Chris W. Cowan, Pieter Dikkes, Stanley J. Korsmeyer, et Michael E. Greenberg. 2002. « Survival Factor-Mediated BAD Phosphorylation Raises the Mitochondrial Threshold for Apoptosis ». *Developmental Cell* 3 (5): 631-43.
- Davis, R. E., K. D. Brown, U. Siebenlist, et L. M. Staudt. 2001. « Constitutive Nuclear Factor kappaB Activity Is Required for Survival of Activated B Cell-like Diffuse Large B Cell Lymphoma Cells ». *The Journal of Experimental Medicine* 194 (12): 1861-74.
- de Bruin, Elza C., et Jan Paul Medema. 2008. « Apoptosis and Non-Apoptotic Deaths in Cancer Development and Treatment Response ». *Cancer Treatment Reviews* 34 (8): 737-49. doi:10.1016/j.ctrv.2008.07.001.
- Delcros, Jean-Guy, et Patrick Mehlen. 2013. « [Dependence receptors: life or death choices] ». *Bulletin Du Cancer* 100 (12): 1261-74. doi:10.1684/bdc.2013.1858.
- Delloye-Bourgeois, Céline, Benjamin Gibert, Nicolas Rama, Jean-Guy Delcros, Nicolas Gadot, Jean-Yves Scoazec, Robert Krauss, Agnès Bernet, et Patrick Mehlen. 2013. « Sonic Hedgehog Promotes Tumor Cell Survival by Inhibiting CDON pro-Apoptotic Activity ». *PLoS Biology* 11 (8): e1001623. doi:10.1371/journal.pbio.1001623.
- Duman-Scheel, M. 2009. « Netrin and DCC: Axon Guidance Regulators at the Intersection of Nervous System Development and Cancer ». *Current drug targets* 10 (7): 602-10.
- Eder, Piotr, Liliana Lykowska-Szuber, Kamila Stawczyk-Eder, Iwona Krela-Kaźmierczak, et Krzysztof Linke. 2014. « Alterations in Programmed Cell Death Mechanism and Their Role in the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Diseases ». *Przegląd Gastroenterologiczny* 9 (5): 275-79. doi:10.5114/pg.2014.46162.
- Elgendy, Mohamed, Clare Sheridan, Gabriela Brumatti, et Seamus J. Martin. 2011. « Oncogenic Ras-Induced Expression of Noxa and Beclin-1 Promotes Autophagic Cell Death and Limits Clonogenic Survival ». *Molecular Cell* 42 (1): 23-35. doi:10.1016/j.molcel.2011.02.009.
- Espinosa, I., J. Briones, R. Bordes, S. Brunet, R. Martino, A. Sureda, J. Sierra, et J. Prat. 2008. « Activation of the NF-kappaB Signalling Pathway in Diffuse Large B-Cell Lymphoma: Clinical Implications ». *Histopathology* 53 (4): 441-49. doi:10.1111/j.1365-2559.2008.03139.x.
- Fang, Hang, et Frank Beier. 2014. « Mouse Models of Osteoarthritis: Modelling Risk Factors and Assessing Outcomes ». *Nature Reviews. Rheumatology* 10 (7): 413-21. doi:10.1038/nrrheum.2014.46.
- Fazeli, A., S. L. Dickinson, M. L. Hermiston, R. V. Tighe, R. G. Steen, C. G. Small, E. T. Stoeckli, et al. 1997. « Phenotype of Mice Lacking Functional Deleted in Colorectal Cancer (Dcc) Gene ». *Nature* 386 (6627): 796-804. doi:10.1038/386796a0.

- Ferreri, A. J., S. Dell Oro, et M. Reni. 2003. « Guidelines for the Treatment of Primary Central Nervous System Lymphomas in Immunocompetent Patients ». *Forum (Genoa, Italy)* 13 (1): 33-45.
- Frantz, Christian, Kathleen M. Stewart, et Valerie M. Weaver. 2010. « The extracellular matrix at a glance ». *Journal of Cell Science* 123 (24): 4195-4200. doi:10.1242/jcs.023820.
- Frith, C. H., J. M. Ward, et M. Chandra. 1993. « The Morphology, Immunohistochemistry, and Incidence of Hematopoietic Neoplasms in Mice and Rats ». *Toxicologic Pathology* 21 (2): 206-18.
- Furne, Céline, Jerome Ricard, Jorge Ruben Cabrera, Laurent Pays, John R. Bethea, Patrick Mehlen, et Daniel J. Liebl. 2009. « EphrinB3 Is an Anti-Apoptotic Ligand That Inhibits the Dependence Receptor Functions of EphA4 Receptors during Adult Neurogenesis ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1793 (2): 231-38. doi:10.1016/j.bbamcr.2008.09.009.
- Gabashvili, Irene S., Bernd H. A. Sokolowski, Cynthia C. Morton, et Anne B. S. Giersch. 2007. « Ion Channel Gene Expression in the Inner Ear ». *Journal of the Association for Research in Otolaryngology: JARO* 8 (3): 305-28. doi:10.1007/s10162-007-0082-y.
- Gao, Yue, Shuyun Liu, Jingxiang Huang, Weimin Guo, Jifeng Chen, Li Zhang, Bin Zhao, et al. 2014. « The ECM-Cell Interaction of Cartilage Extracellular Matrix on Chondrocytes ». *BioMed Research International* 2014. doi:10.1155/2014/648459.
- Garbe, David S., et Greg J. Bashaw. 2007. « Independent Functions of Slit-Robo Repulsion and Netrin-Frazzled Attraction Regulate Axon Crossing at the Midline in Drosophila ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 27 (13): 3584-92. doi:10.1523/JNEUROSCI.0301-07.2007.
- Gibert, Benjamin, Céline Delloye-Bourgeois, Charles-Henry Gattolliat, Olivier Meurette, Solen Le Guernevel, Joanna Fombonne, Benjamin Ducarouge, et al. 2014. « Regulation by miR181 Family of the Dependence Receptor CDON Tumor Suppressive Activity in Neuroblastoma ». *Journal of the National Cancer Institute* 106 (11). doi:10.1093/jnci/dju318.
- Gibert, Benjamin, et Patrick Mehlen. 2015. « Dependence Receptors and Cancer: Addiction to Trophic Ligands ». *Cancer Research* 75 (24): 5171-75. doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-3652.
- Gillies, Allison R., et Richard L. Lieber. 2011. « Structure and Function of the Skeletal Muscle Extracellular Matrix ». *Muscle & Nerve* 44 (3): 318-31. doi:10.1002/mus.22094.
- Gomez, Liborio, et F. H. Pike. 1909. « THE HISTOLOGICAL CHANGES IN NERVE CELLS DUE TO TOTAL TEMPORARY ANÆMIA OF THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM ». *The Journal of Experimental Medicine* 11 (2): 257-65.
- Goodrich, L. V., L. Milenković, K. M. Higgins, et M. P. Scott. 1997. « Altered Neural Cell Fates and Medulloblastoma in Mouse Patched Mutants ». *Science (New York, N.Y.)* 277 (5329): 1109-13.
- Green, D. R., et C. F. Ware. 1997. « Fas-Ligand: Privilege and Peril ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (12): 5986-90.
- Green, Douglas R., et Fabien Llambi. 2015. « Cell Death Signaling ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 7 (12): a006080. doi:10.1101/cshperspect.a006080.
- Guenebeaud, Céline, David Goldschneider, Marie Castets, Catherine Guix, Guillaume Chazot, Céline Delloye-Bourgeois, Avital Eisenberg-Lerner, et al. 2010. « The Dependence Receptor UNC5H2/B Triggers Apoptosis via PP2A-Mediated

- Dephosphorylation of DAP Kinase ». *Molecular Cell* 40 (6): 863-76.
doi:10.1016/j.molcel.2010.11.021.
- Häcker, G. 2000. « The Morphology of Apoptosis ». *Cell and Tissue Research* 301 (1): 5-17.
- Hanahan, Douglas, et Robert A. Weinberg. 2011. « Hallmarks of Cancer: The next Generation ». *Cell* 144 (5): 646-74. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013.
- Harvey, M., M. J. McArthur, C. A. Montgomery, J. S. Butel, A. Bradley, et L. A. Donehower. 1993. « Spontaneous and Carcinogen-Induced Tumorigenesis in p53-Deficient Mice ». *Nature Genetics* 5 (3): 225-29. doi:10.1038/ng1193-225.
- Hata, Aaron N., Jeffrey A. Engelman, et Anthony C. Faber. 2015. « The BCL2 Family: Key Mediators of the Apoptotic Response to Targeted Anticancer Therapeutics ». *Cancer Discovery* 5 (5): 475-87. doi:10.1158/2159-8290.CD-15-0011.
- Hirohata, Satoshi, Lauren W. Wang, Masaru Miyagi, Lin Yan, Michael F. Seldin, Douglas R. Keene, John W. Crabb, et Suneel S. Apte. 2002. « Punctin, a Novel ADAMTS-like Molecule, ADAMTSL-1, in Extracellular Matrix ». *The Journal of Biological Chemistry* 277 (14): 12182-89. doi:10.1074/jbc.M109665200.
- Holler, N., R. Zaru, O. Micheau, M. Thome, A. Attinger, S. Valitutti, J. L. Bodmer, P. Schneider, B. Seed, et J. Tschopp. 2000. « Fas Triggers an Alternative, Caspase-8-Independent Cell Death Pathway Using the Kinase RIP as Effector Molecule ». *Nature Immunology* 1 (6): 489-95. doi:10.1038/82732.
- Huang, Ying, Xiang Yang, Tianrui Xu, Qinghong Kong, Yaping Zhang, Yuehai Shen, Yunlin Wei, Guanlin Wang, et Kwen-Jen Chang. 2016. « Overcoming Resistance to TRAIL-Induced Apoptosis in Solid Tumor Cells by Simultaneously Targeting Death Receptors, c-FLIP and IAPs ». *International Journal of Oncology* 49 (1): 153-63. doi:10.3892/ijo.2016.3525.
- Ichim, Gabriel, Anne-Laure Genevois, Marie Ménard, Li-Ying Yu, Juliana M. Coelho-Aguiar, Fabien Llambi, Loraine Jarrosson-Wuilleme, et al. 2013. « The Dependence Receptor TrkC Triggers Mitochondria-Dependent Apoptosis upon Cobra-1 Recruitment ». *Molecular Cell* 51 (5): 632-46. doi:10.1016/j.molcel.2013.08.021.
- Joe, Aaron W. B., Lin Yi, Anuradha Natarajan, Fabien Le Grand, Leslie So, Joy Wang, Michael A. Rudnicki, et Fabio M. V. Rossi. 2010. « Muscle Injury Activates Resident Fibro/Adipogenic Progenitors That Facilitate Myogenesis ». *Nature Cell Biology* 12 (2): 153-63. doi:10.1038/ncb2015.
- Kasten, F. H. 1996. « Paul Ehrlich: Pathfinder in Cell Biology. 1. Chronicle of His Life and Accomplishments in Immunology, Cancer Research, and Chemotherapy ». *Biotechnic & Histochemistry: Official Publication of the Biological Stain Commission* 71 (1): 2-37.
- Kelwick, Richard, Ines Desanlis, Grant N. Wheeler, et Dylan R. Edwards. 2015. « The ADAMTS (A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs) Family ». *Genome Biology* 16: 113. doi:10.1186/s13059-015-0676-3.
- Kerr, J. F., A. H. Wyllie, et A. R. Currie. 1972. « Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wide-Ranging Implications in Tissue Kinetics ». *British Journal of Cancer* 26 (4): 239-57.
- Kerr, John F. R. 2002. « History of the Events Leading to the Formulation of the Apoptosis Concept ». *Toxicology* 181-182 (décembre): 471-74.
- Kolodziej, P. A., L. C. Timpe, K. J. Mitchell, S. R. Fried, C. S. Goodman, L. Y. Jan, et Y. N. Jan. 1996. « Frazzled Encodes a Drosophila Member of the DCC Immunoglobulin

- Subfamily and Is Required for CNS and Motor Axon Guidance ». *Cell* 87 (2): 197-204.
- Koo, Bon-Hun, Tiina Hurskainen, Katrina Mielke, Phyu Phyu Aung, Graham Casey, Helena Autio-Harmainen, et Suneel S. Apte. 2007. « ADAMTSL3/Punctin-2, a Gene Frequently Mutated in Colorectal Tumors, Is Widely Expressed in Normal and Malignant Epithelial Cells, Vascular Endothelial Cells and Other Cell Types, and Its mRNA Is Reduced in Colon Cancer ». *International Journal of Cancer* 121 (8): 1710-16. doi:10.1002/ijc.22882.
- Krimpenfort, Paul, Ji-Ying Song, Natalie Proost, John Zevenhoven, Jos Jonkers, et Anton Berns. 2012. « Deleted in Colorectal Carcinoma Suppresses Metastasis in p53-Deficient Mammary Tumours ». *Nature* 482 (7386): 538-41. doi:10.1038/nature10790.
- Kristiansen, M., et J. Ham. 2014. « Programmed Cell Death during Neuronal Development: The Sympathetic Neuron Model ». *Cell Death & Differentiation* 21 (7): 1025-35. doi:10.1038/cdd.2014.47.
- Kroemer, Guido, et Beth Levine. 2008. « Autophagic Cell Death: The Story of a Misnomer ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9 (12): 1004-10. doi:10.1038/nrm2529.
- Langley, J. N. 1905. « On the reaction of cells and of nerve-endings to certain poisons, chiefly as regards the reaction of striated muscle to nicotine and to curari ». *The Journal of Physiology* 33 (4-5): 374-413.
- Lawn, Samuel, Niveditha Krishna, Alexandra Pisklakova, Xiaotao Qu, David A. Fenstermacher, Michelle Fournier, Frank D. Vrionis, et al. 2015. « Neurotrophin Signaling via TrkB and TrkC Receptors Promotes the Growth of Brain Tumor-Initiating Cells ». *The Journal of Biological Chemistry* 290 (6): 3814-24. doi:10.1074/jbc.M114.599373.
- Le Goff, Carine, Fanny Morice-Picard, Nathalie Dagoneau, Lauren W. Wang, Claire Perrot, Yanick J. Crow, Florence Bauer, et al. 2008. « ADAMTSL2 Mutations in Geleophysic Dysplasia Demonstrate a Role for ADAMTS-like Proteins in TGF-Beta Bioavailability Regulation ». *Nature Genetics* 40 (9): 1119-23. doi:10.1038/ng.199.
- Li, J., et J. Yuan. 2008. « Caspases in Apoptosis and beyond ». *Oncogene* 27 (48): 6194-6206. doi:10.1038/onc.2008.297.
- Li, Xiaoli, Yanyan Cen, Yongqing Cai, Tao Liu, Huan Liu, Guanqun Cao, Dan Liu, et al. 2016. « TLR9-ERK-mTOR Signaling Is Critical for Autophagic Cell Death Induced by CpG Oligodeoxynucleotide 107 Combined with Irradiation in Glioma Cells ». *Scientific Reports* 6: 27104. doi:10.1038/srep27104.
- Louie, E., X. F. Chen, A. Coomes, K. Ji, S. Tsirka, et E. I. Chen. 2013. « Neurotrophin-3 Modulates Breast Cancer Cells and the Microenvironment to Promote the Growth of Breast Cancer Brain Metastasis ». *Oncogene* 32 (35): 4064-77. doi:10.1038/onc.2012.417.
- Lu, Pengfei, Valerie M. Weaver, et Zena Werb. 2012. « The Extracellular Matrix: A Dynamic Niche in Cancer Progression ». *The Journal of Cell Biology* 196 (4): 395-406. doi:10.1083/jcb.201102147.
- MAEHLE, ANDREAS-HOLGER. 2004. « "Receptive Substances": John Newport Langley (1852–1925) and his Path to a Receptor Theory of Drug Action ». *Medical History* 48 (2): 153-74.

- Mayhew, T. M., R. Myklebust, A. Whybrow, et R. Jenkins. 1999. « Epithelial Integrity, Cell Death and Cell Loss in Mammalian Small Intestine ». *Histology and Histopathology* 14 (1): 257-67.
- Mayne, Richard, et Ralph D. Sanderson. 1985. « The Extracellular Matrix of Skeletal Muscle ». *Collagen and Related Research* 5 (5): 449-68. doi:10.1016/S0174-173X(85)80032-7.
- Mazarakis, N. D., A. D. Edwards, et H. Mehmet. 1997. « Apoptosis in Neural Development and Disease ». *Archives of Disease in Childhood. Fetal and Neonatal Edition* 77 (3): F165-170.
- Mehlen, P., S. Rabizadeh, S. J. Snipas, N. Assa-Munt, G. S. Salvesen, et D. E. Bredesen. 1998. « The DCC Gene Product Induces Apoptosis by a Mechanism Requiring Receptor Proteolysis ». *Nature* 395 (6704): 801-4. doi:10.1038/27441.
- Mehlen, Patrick, Céline Delloye-Bourgeois, et Alain Chédotal. 2011. « Novel Roles for Slits and Netrins: Axon Guidance Cues as Anticancer Targets? » *Nature Reviews Cancer* 11 (3): 188-97. doi:10.1038/nrc3005.
- Micheau, Olivier, et Jürg Tschopp. 2003. « Induction of TNF Receptor I-Mediated Apoptosis via Two Sequential Signaling Complexes ». *Cell* 114 (2): 181-90.
- Miguez, P.A., M. Terajima, H. Nagaoka, Y. Mochida, et M. Yamauchi. 2011. « Role of Glycosaminoglycans of Biglycan in BMP-2 Signaling ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 405 (2): 262-66. doi:10.1016/j.bbrc.2011.01.022.
- Mille, Frédéric, Chantal Thibert, Joanna Fombonne, Nicolas Rama, Catherine Guix, Hideki Hayashi, Véronique Corset, John C. Reed, et Patrick Mehlen. 2009. « The Patched Dependence Receptor Triggers Apoptosis through a DRAL-Caspase-9 Complex ». *Nature Cell Biology* 11 (6): 739-46. doi:10.1038/ncb1880.
- Molinoff, P. B., et L. T. Potter. 1972. « Isolation of the Cholinergic Receptor Protein of Torpedo Electric Tissue ». *Advances in Biochemical Psychopharmacology* 6: 111-34.
- Montero, Juan A., et Juan M. Hurlé. 2010. « Sculpturing Digit Shape by Cell Death ». *Apoptosis: An International Journal on Programmed Cell Death* 15 (3): 365-75. doi:10.1007/s10495-009-0444-5.
- Musaro, Antonio, Musaro, et Antonio. 2014. « The Basis of Muscle Regeneration, The Basis of Muscle Regeneration ». *Advances in Biology, Advances in Biology* 2014, 2014 (juillet): e612471. doi:10.1155/2014/612471, 10.1155/2014/612471.
- Nakayama, Kazutaka, Koiti Inokuchi, et Kazuo Dan. 2005. « Hypermethylation of the Putative Tumor-Suppressor Genes DCC, p51/63 and O6-Methylguanine-DNA Methyltransferase (MGMT) and Loss of Their Expressions in Cell Lines of Hematological Malignancies ». *Journal of Nippon Medical School = Nippon Ika Daigaku Zasshi* 72 (5): 270-77.
- Narayanan, R., K. G. Lawlor, R. Q. Schaapveld, K. R. Cho, B. Vogelstein, P. Bui-Vinh Tran, M. P. Osborne, et N. T. Telang. 1992. « Antisense RNA to the Putative Tumor-Suppressor Gene DCC Transforms Rat-1 Fibroblasts ». *Oncogene* 7 (3): 553-61.
- Neill, Thomas, Liliana Schaefer, et Renato V. Iozzo. 2012. « Decorin: A Guardian from the Matrix ». *The American Journal of Pathology* 181 (2): 380-87. doi:10.1016/j.ajpath.2012.04.029.
- Neuhaus-Follini, Alexandra, et Greg J. Bashaw. 2015. « The Intracellular Domain of the Frazzled/DCC Receptor Is a Transcription Factor Required for Commissural Axon Guidance ». *Neuron* 87 (4): 751-63. doi:10.1016/j.neuron.2015.08.006.

- Neves, Susana R., Prahlad T. Ram, et Ravi Iyengar. 2002. « G Protein Pathways ». *Science (New York, N.Y.)* 296 (5573): 1636-39. doi:10.1126/science.1071550.
- Nikoletopoulou, Vassiliki, Maria Markaki, Konstantinos Palikaras, et Nektarios Tavernarakis. 2013. « Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1833 (12): 3448-59. doi:10.1016/j.bbamcr.2013.06.001.
- Norris, Adam D., et Erik A. Lundquist. 2011. « UNC-6/netrin and its receptors UNC-5 and UNC-40/DCC modulate growth cone protrusion in vivo in *C. elegans* ». *Development (Cambridge, England)* 138 (20): 4433-42. doi:10.1242/dev.068841.
- Opferman, J. T. 2008. « Apoptosis in the Development of the Immune System ». *Cell Death and Differentiation* 15 (2): 234-42. doi:10.1038/sj.cdd.4402182.
- Oppenheim, R. W. 1989. « The Neurotrophic Theory and Naturally Occurring Motoneuron Death ». *Trends in Neurosciences* 12 (7): 252-55.
- Ozmadenci, Duygu, Olivier Féraud, Suzy Markossian, Elsa Kress, Benjamin Ducarouge, Benjamin Gibert, Jian Ge, et al. 2015. « Netrin-1 Regulates Somatic Cell Reprogramming and Pluripotency Maintenance ». *Nature Communications* 6: 7398. doi:10.1038/ncomms8398.
- Paradisi, Andrea, Marion Creveaux, Benjamin Gibert, Guillaume Devailly, Emeline Redoulez, David Neves, Elsa Cleysac, et al. 2013. « Combining Chemotherapeutic Agents and Netrin-1 Interference Potentiates Cancer Cell Death ». *EMBO Molecular Medicine* 5 (12): 1821-34. doi:10.1002/emmm.201302654.
- Paradisi, Andrea, Carine Maise, Marie-May Coissieux, Nicolas Gadot, Florian Lépinasse, Céline Delloye-Bourgeois, Jean-Guy Delcros, et al. 2009. « Netrin-1 up-Regulation in Inflammatory Bowel Diseases Is Required for Colorectal Cancer Progression ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (40): 17146-51. doi:10.1073/pnas.0901767106.
- Proskuryakov, Sergey Ya, Anatoli G. Konoplyannikov, et Vladimir L. Gabai. 2003. « Necrosis: A Specific Form of Programmed Cell Death? ». *Experimental Cell Research* 283 (1): 1-16.
- Raff, M. C. 1992. « Social Controls on Cell Survival and Cell Death ». *Nature* 356 (6368): 397-400. doi:10.1038/356397a0.
- Reichardt, Louis F. 2006. « Neurotrophin-Regulated Signalling Pathways ». *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 361 (1473): 1545-64. doi:10.1098/rstb.2006.1894.
- Ricard, Jerome, Jessica Salinas, Lissette Garcia, et Daniel J. Liebl. 2006. « EphrinB3 Regulates Cell Proliferation and Survival in Adult Neurogenesis ». *Molecular and Cellular Neurosciences* 31 (4): 713-22. doi:10.1016/j.mcn.2006.01.002.
- Richter, Julia, Ole Ammerpohl, José I. Martín-Subero, Manuel Montesinos-Rongen, Marina Bibikova, Eliza Wickham-Garcia, Otmar D. Wiestler, Martina Deckert, et Reiner Siebert. 2009. « Array-Based DNA Methylation Profiling of Primary Lymphomas of the Central Nervous System ». *BMC Cancer* 9: 455. doi:10.1186/1471-2407-9-455.
- Rimkus, Tadas K., Richard L. Carpenter, Shadi Qasem, Michael Chan, et Hui-Wen Lo. 2016. « Targeting the Sonic Hedgehog Signaling Pathway: Review of Smoothed and GLI Inhibitors ». *Cancers* 8 (2). doi:10.3390/cancers8020022.
- Roschewski, Mark, Louis M. Staudt, et Wyndham H. Wilson. 2014. « Diffuse Large B-Cell Lymphoma-Treatment Approaches in the Molecular Era ». *Nature Reviews. Clinical Oncology* 11 (1): 12-23. doi:10.1038/nrclinonc.2013.197.

- Ryu, Jae Ryun, Caroline Jeeyeon Hong, Joo Yeon Kim, Eun-Kyoung Kim, Woong Sun, et Seong-Woon Yu. 2016. « Control of Adult Neurogenesis by Programmed Cell Death in the Mammalian Brain ». *Molecular Brain* 9: 43. doi:10.1186/s13041-016-0224-4.
- Sabnis, Amit J., Christopher J. Guerriero, Victor Olivas, Anin Sayana, Jonathan Shue, Jennifer Flanagan, Saurabh Asthana, et al. 2016. « Combined Chemical-Genetic Approach Identifies Cytosolic HSP70 Dependence in Rhabdomyosarcoma ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, juillet. doi:10.1073/pnas.1603883113.
- Saito, Masahiro, Misaki Kurokawa, Masahito Oda, Masamitsu Oshima, Ko Tsutsui, Kazutaka Kosaka, Kazuhisa Nakao, et al. 2011. « ADAMTSL6 β Protein Rescues Fibrillin-1 Microfibril Disorder in a Marfan Syndrome Mouse Model through the Promotion of Fibrillin-1 Assembly ». *The Journal of Biological Chemistry* 286 (44): 38602-13. doi:10.1074/jbc.M111.243451.
- Salvesen, Guy S. 2002. « Caspases and Apoptosis ». *Essays in Biochemistry* 38: 9-19.
- Scales, Suzie J., et Frederic J. de Sauvage. 2009. « Mechanisms of Hedgehog Pathway Activation in Cancer and Implications for Therapy ». *Trends in Pharmacological Sciences* 30 (6): 303-12. doi:10.1016/j.tips.2009.03.007.
- Schaefer, Liliana, et Roland M. Schaefer. 2009. « Proteoglycans: From Structural Compounds to Signaling Molecules ». *Cell and Tissue Research* 339 (1): 237. doi:10.1007/s00441-009-0821-y.
- Schlessinger, Joseph, et Mark A. Lemmon. 2003. « SH2 and PTB Domains in Tyrosine Kinase Signaling ». *Science's STKE: Signal Transduction Knowledge Environment* 2003 (191): RE12. doi:10.1126/stke.2003.191.re12.
- Schweichel, J. U., et H. J. Merker. 1973. « The Morphology of Various Types of Cell Death in Prenatal Tissues ». *Teratology* 7 (3): 253-66. doi:10.1002/tera.1420070306.
- Seetharaman, Ashwin, Guillermo Selman, Rachel Puckrin, Louis Barbier, Eric Wong, Serena A. D'Souza, et Peter J. Roy. 2011. « MADD-4 Is a Secreted Cue Required for Midline-Oriented Guidance in *Caenorhabditis Elegans* ». *Developmental Cell* 21 (4): 669-80. doi:10.1016/j.devcel.2011.07.020.
- Shaffer, Arthur L., Ryan M. Young, et Louis M. Staudt. 2012. « Pathogenesis of Human B Cell Lymphomas ». *Annual Review of Immunology* 30: 565-610. doi:10.1146/annurev-immunol-020711-075027.
- Shiraishi, Aya, Satsuki Mochizuki, Akira Miyakoshi, Kanehisa Kojoh, et Yasunori Okada. 2016. « Development of Human Neutralizing Antibody to ADAMTS4 (Aggrecanase-1) and ADAMTS5 (Aggrecanase-2) ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 469 (1): 62-69. doi:10.1016/j.bbrc.2015.11.072.
- Starostik, P., A. Greiner, A. Schultz, A. Zettl, K. Peters, A. Rosenwald, M. Kolve, et H. K. Müller-Hermelink. 2000. « Genetic Aberrations Common in Gastric High-Grade Large B-Cell Lymphoma ». *Blood* 95 (4): 1180-87.
- Stewart, et Kleihues. 2005. *Le cancer dans le monde*. IARC press.
- Tauszig-Delamasure, Servane, Li-Ying Yu, Jorge Ruben Cabrera, Jimena Bouzas-Rodriguez, Catherine Mermet-Bouvier, Catherine Guix, Marie-Claire Bordeaux, Urmas Arumäe, et Patrick Mehlen. 2007. « The TrkC Receptor Induces Apoptosis When the Dependence Receptor Notion Meets the Neurotrophin Paradigm ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (33): 13361-66. doi:10.1073/pnas.0701243104.
- Tessarollo, L., P. Tsoulfas, M. J. Donovan, M. E. Palko, J. Blair-Flynn, B. L. Hempstead, et L. F. Parada. 1997. « Targeted Deletion of All Isoforms of the trkC Gene Suggests the

- Use of Alternate Receptors by Its Ligand Neurotrophin-3 in Neuronal Development and Implicates trkC in Normal Cardiogenesis ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (26): 14776-81.
- Tessarollo, L., K. S. Vogel, M. E. Palko, S. W. Reid, et L. F. Parada. 1994. « Targeted Mutation in the Neurotrophin-3 Gene Results in Loss of Muscle Sensory Neurons ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 (25): 11844-48.
- Theocharis, Achilleas D., Spyros S. Skandalis, Chrysostomi Gialeli, et Nikos K. Karamanos. 2016. « Extracellular Matrix Structure ». *Advanced Drug Delivery Reviews* 97 (février): 4-27. doi:10.1016/j.addr.2015.11.001.
- Timmerman, John M., Clemens B. Caspar, Stacie L. Lambert, Athanasia D. Syrengelas, et Ronald Levy. 2001. « Idiotypic-Encoding Recombinant Adenoviruses Provide Protective Immunity against Murine B-Cell Lymphomas ». *Blood* 97 (5): 1370-77. doi:10.1182/blood.V97.5.1370.
- Tsang, Kwok Yeung, Martin C. H. Cheung, Danny Chan, et Kathryn S. E. Cheah. 2009. « The Developmental Roles of the Extracellular Matrix: Beyond Structure to Regulation ». *Cell and Tissue Research* 339 (1): 93. doi:10.1007/s00441-009-0893-8.
- Tsujimoto, Y., et S. Shimizu. 2005. « Another Way to Die: Autophagic Programmed Cell Death ». *Cell Death and Differentiation* 12 Suppl 2 (novembre): 1528-34. doi:10.1038/sj.cdd.4401777.
- Tu, Haijun, Bérangère Pinan-Lucarré, Tingting Ji, Maelle Jospin, et Jean-Louis Bessereau. 2015. « C. Elegans Punctin Clusters GABA(A) Receptors via Neuroligin Binding and UNC-40/DCC Recruitment ». *Neuron* 86 (6): 1407-19. doi:10.1016/j.neuron.2015.05.013.
- Ueno, Manabu, Toshitaka Maeno, Miyuki Nomura, Kana Aoyagi-Ikeda, Hiroki Matsui, Kenichiro Hara, Toru Tanaka, Tatsuya Iso, Tatsuo Suga, et Masahiko Kurabayashi. 2011. « Hypoxia-Inducible Factor-1 α Mediates TGF- β -Induced PAI-1 Production in Alveolar Macrophages in Pulmonary Fibrosis ». *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology* 300 (5): L740-52. doi:10.1152/ajplung.00146.2010.
- Uezumi, Akiyoshi, So-ichiro Fukada, Naoki Yamamoto, Shin 'ichi Takeda, et Kunihiro Tsuchida. 2010. « Mesenchymal Progenitors Distinct from Satellite Cells Contribute to Ectopic Fat Cell Formation in Skeletal Muscle ». *Nature Cell Biology* 12 (2): 143-52. doi:10.1038/ncb2014.
- Vannata, Barbara, et Emanuele Zucca. 2015. « Primary Extranodal B-Cell Lymphoma: Current Concepts and Treatment Strategies ». *Chinese Clinical Oncology* 4 (1): 10. doi:10.3978/j.issn.2304-3865.2014.12.01.
- VanZomeran-Dohm, Adrienne, Joseph Sarro, Ellen Flannery, et Molly Duman-Scheel. 2011. « The Drosophila Netrin Receptor Frazzled/DCC Functions as an Invasive Tumor Suppressor ». *BMC Developmental Biology* 11: 41. doi:10.1186/1471-213X-11-41.
- Vassilatis, Demetrios K., John G. Hohmann, Hongkui Zeng, Fusheng Li, Jane E. Ranchalis, Marty T. Mortrud, Analisa Brown, et al. 2003. « The G Protein-Coupled Receptor Repertoires of Human and Mouse ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (8): 4903-8. doi:10.1073/pnas.0230374100.
- Wang, Lauren W., Malgosia Dlugosz, Robert P. T. Somerville, Mona Raed, Robert S. Haltiwanger, et Suneel S. Apte. 2007. « O-Fucosylation of Thrombospondin Type

- 1 Repeats in ADAMTS-like-1/Punctin-1 Regulates Secretion: Implications for the ADAMTS Superfamily ». *The Journal of Biological Chemistry* 282 (23): 17024-31. doi:10.1074/jbc.M701065200.
- Wilcox, Nicholas S., Jinxiu Rui, Matthias Hebrok, et Kevan C. Herold. 2016. « Life and Death of β Cells in Type 1 Diabetes: A Comprehensive Review ». *Journal of Autoimmunity* 71 (juillet): 51-58. doi:10.1016/j.jaut.2016.02.001.
- Wolfsberg, T. G., P. Primakoff, D. G. Myles, et J. M. White. 1995. « ADAM, a Novel Family of Membrane Proteins Containing A Disintegrin And Metalloprotease Domain: Multipotential Functions in Cell-Cell and Cell-Matrix Interactions ». *The Journal of Cell Biology* 131 (2): 275-78.
- Yarden, Y., et M. X. Sliwkowski. 2001. « Untangling the ErbB Signalling Network ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 2 (2): 127-37. doi:10.1038/35052073.
- Younes, A., S. Zhao, D. Jendiroba, H. D. Kleine, F. Cabanillas, et M. Andreeff. 1995. « Decreased Expression of the Deleted in Colorectal Carcinoma Gene in Non-Hodgkin's Lymphoma ». *Blood* 85 (10): 2813-16.
- Yu, Li, Ajjai Alva, Helen Su, Parmesh Dutt, Eric Freundt, Sarah Welsh, Eric H. Baehrecke, et Michael J. Lenardo. 2004. « Regulation of an ATG7-Beclin 1 Program of Autophagic Cell Death by Caspase-8 ». *Science (New York, N.Y.)* 304 (5676): 1500-1502. doi:10.1126/science.1096645.
- Yuan, J., S. Shaham, S. Ledoux, H. M. Ellis, et H. R. Horvitz. 1993. « The C. Elegans Cell Death Gene Ced-3 Encodes a Protein Similar to Mammalian Interleukin-1 Beta-Converting Enzyme ». *Cell* 75 (4): 641-52.
- Zhang, Yaping, Wei Xu, Hong Liu, et Jianyong Li. 2016. « Therapeutic Options in Peripheral T Cell Lymphoma ». *Journal of Hematology & Oncology* 9: 37. doi:10.1186/s13045-016-0267-0.