



HAL
open science

Identification des voies de signalisations impliquées dans l'activité pro-apoptotique du récepteur à dépendance UNC5B

Ambroise Manceau

► **To cite this version:**

Ambroise Manceau. Identification des voies de signalisations impliquées dans l'activité pro-apoptotique du récepteur à dépendance UNC5B. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université de Lyon, 2021. Français. NNT : 2021LYSE1005 . tel-04010758

HAL Id: tel-04010758

<https://theses.hal.science/tel-04010758>

Submitted on 2 Mar 2023

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 :
2021LYSE1005

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

opérée au sein de

l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale N° 340

Biologie Moléculaire Intégrative et Cellulaire

Spécialité de doctorat :

Discipline : Biologie Cellulaire et Moléculaire

Soutenue publiquement le 14/01/2021, par :

Ambroise MANCEAU

Identification des voies de signalisations impliquées dans l'activité pro-apoptotique du récepteur à dépendance UNC5B

Devant le jury composé de :

MOYRET-LALLE Caroline	Professeur des Universités, UCBL1, Lyon	Présidente
DESAGHER Solange	Chargée de Recherche, IGMM, Montpellier	Rapporteuse
RICCI Jean-Ehrland	Directeur de Recherche, C3M, Nice	Rapporteur
JUIN Philippe	Directeur de Recherche, CRCI, Nantes	Examineur
MEHLEN Patrick	Directeur de Recherche, CRCL, Lyon	Examineur
PARADISI Andrea	Chargé de Recherche, CRCL, Lyon	Directeur de thèse

Université Claude Bernard – LYON 1

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

COMPOSANTES SANTE

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

COMPOSANTES & DEPARTEMENTS DE SCIENCES & TECHNOLOGIE

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

Remerciements

Je pense que je n'apprendrai rien aux lecteurs/trices de ce manuscrit, 4 années de thèse peuvent être éprouvantes. Les rares moments d'euphorie suivant une avancée dans le projet font souvent place à de longues semaines, voire de longs mois, de disette. Malgré cela, cette thèse aura été une période particulièrement enrichissante et heureuse de ma vie, avant tout grâce au soutien et la bienveillance des personnes avec qui j'ai pu travailler, échanger, argumenter, partager et rire. Je vous remercie d'avoir été là pour moi.

Avant tout, je tiens à remercier les membres du jury, Dr. Solange Desagher, Pr Caroline Moyret-Lalle, Dr Jean- Ehrland Ricci et le Dr Philippe Juin pour avoir accepté d'évaluer mon travail. Je remercie particulièrement mes rapporteurs qui ont fourni un retour particulièrement détaillé et attentif sur mon travail d'écriture. Je remercie aussi les membres de mon comité de suivi de thèse, Bertrand Mollereau et Olivier Micheau pour leurs conseils avisés.

Sans la confiance qui m'a été accordée dès le premier jour par Patrick et Andrea, je ne serais probablement pas là à écrire ces lignes aujourd'hui, je tiens donc à les remercier tout particulièrement. Merci à Patrick d'avoir cru en mon profil d'ingénieur pas très spécialiste, et à Andrea de m'avoir guidé pendant ce voyage, tout en me laissant prendre mon propre chemin lorsque je le désirais.

Merci à Carine et Marie, collaboratrices, qui nous ont apporté leur expertise pour la mise en place de la banque cellulaire CRISPR-Cas9.

Merci à Sophie de m'avoir accueilli dans la plateforme ex-vivo, pour ce que tu m'y a enseigné et pour ta bonne humeur. Merci à Priscillia, pour avoir toujours été disponible pour venir à mon secours lorsque j'avais un souci avec le cytomètre.

Ensuite, un énorme merci à la team Paradisi. Lisa, je ne te remercierai jamais assez pour le travail que tu as pu faire pour moi cette dernière année. Au-delà de ça, j'ai découvert une personne altruiste et brillante, et une redoutable joueuse du jeu des prénoms. Merci à Lucas, dit « LDC », avec qui j'aurais aimé travailler plus longtemps, mais qui s'est révélé être un ami dévoué, ainsi qu'un redoutable grimpeur. Je suis pressé de retourner à l'escalade pour te voir flasher des noires. Merci à Yan, qui a partagé en même temps que moi toutes ces années de bonheurs et de galères C'est toujours un plaisir d'échanger nos points de vue parfois très différents. Love U Baby ! Merci à Swarna et Isaure, pour m'avoir fait confiance et avoir été réceptives à ma piètre pédagogie. Finalement, merci « d'avance » à Nathalie et Allison, je suis sûr que l'avenir de la team Paradisi est entre de bonnes mains !

Je voudrais ensuite remercier Gab et Johanna pour leurs précieux conseils concernant mon projet, qui m'ont permis de prendre du recul et de me poser les bonnes questions. Je remercie aussi particulièrement David N., compagnon du confinement, sans qui l'*in-vivo* aurait été bien plus difficile et beaucoup moins fun.

Merci à David G. pour les conseils techniques et les leçons de culture générale, même très tard le soir au labo. Merci aussi à Benj, Nico et Ficus pour m'avoir partagé leur savoir. Merci à Yohann, pour sa prévenance et sans qui j'aurais probablement travaillé bénévolement cette dernière année.

Mélissa, je te remercie pour avoir été toujours présente pour moi depuis mon arrivée au labo. Tu as été un vrai modèle pour moi au cours de cette thèse, mais surtout une amie et un soutien sans faille, dans les bons comme dans les mauvais moments. Merci infiniment pour tout.

Merci Olivier, avec qui j'ai toujours plaisir à échanger et apprendre sur la science, la philosophie, ou même sur Armand et, surtout, Jeanne ! Merci Thomas, tu es la gentillesse incarnée. Pour reprendre tes termes, je dirais que tu es vraiment « une belle personne ». Je retourne aussi grimper avec vous dès que les salles réouvrent !

Merci « au bureau des post-docs » pour m'avoir accueilli, et surtout supporté pendant l'écriture de ma thèse. Merci à Lena, et surtout Kristina et Sonia, qui ont enduré tous mes craquages et qui ont rendu l'écriture de cette thèse beaucoup plus agréable et moins stressante qu'elle aurait dû/pu l'être.

Merci aux thésards, compagnons de joie et d'infortune. A Anna-Rita, avec qui on s'aime et on se déchire. A Mathieu, mon consultant sportif, avec qui j'ai toujours plaisir à parler de sport. A Verena, qui a su supporter mon horrible accent anglais pendant toutes ces années. A Mélanie et Laura pour leur bonne humeur et leur folie. A Maëva, Sylvia et Camille, la relève qui fera de grandes choses !

Merci à Cathy, voisine de paillasse, avec qui on peut discuter de tout et de rien. Merci aussi à Céline et Sarah, grandes organisatrices, sans qui le chaos s'emparerait du labo. Sarah, merci aussi pour ton dévouement pour la vie sociale du labo !

Je n'oublie pas aussi les anciens et légendes d'autrefois. Merci à Hong, mon aîné, avec qui j'ai beaucoup appris et aimé discuter des différences entre nos cultures. Merci à Giacomo, pour toutes ces pauses café, ces confidences et ces bons moments, j'espère que je pourrais passer te voir à Toronto dès que possible ! Merci à Justine, avec qui j'ai hâte de refaire une vraie partie de loup-garou, et merci à Miami, pour m'avoir tenu compagnie pendant presque un an. Merci à Jéro, toujours les bonnes adresses et bons plans pour les vacances ou les restos où je suis pressé de retourner. Merci à Stephany, pour m'avoir fait découvrir le yoga, tu as presque fait de moi un vrai yogi. Merci à Thibault, que j'ai vu en passage éclair au labo mais qui s'est révélé un parfait compagnon d'aventure et de mésaventure à l'Île Maurice. Merci Kathleen et Laura, avec qui j'aurai toujours plaisir à collaborer sur une grille de mot fléchés. Enfin merci à Shushu, Ana et Paulette, supers thésardes qui m'ont inspirées dès le début de la thèse.

Finalement, je dédie cette thèse à ma famille, soutien de toujours, qui m'a laissé le temps de faire des erreurs pour trouver ma voie, et sans qui rien n'aurait été possible. Merci.

Table des matières

Remerciements	1
Table des matières	3
Liste des abréviations.....	5
Liste des figures.....	9
Liste des tableaux	9
Introduction.....	12
Chapitre 1 : Mort cellulaire et Apoptose	13
1. Mort cellulaire, avec ou sans préméditation ?.....	13
2. Les armes du crime - Classification des différents types de mort cellulaire programmée.....	14
3. L'Apoptose, le crime parfait.....	16
a) Généralités.....	16
b) Les caspases, l'assassin efficace.....	16
c) Le mobile du crime - Rôle physiologique de l'apoptose	18
i. Développement.....	18
ii. Homéostasie	19
d) L'homicide involontaire – L'apoptose dans les pathologies.....	19
i. Défense contre les pathogènes.....	19
ii. Maladies neurologiques.....	20
iii. Maladies auto-immunes	20
iv. Cancer.....	20
e) Mode opératoire d'un serial killer - principales voies de signalisation.....	24
i. Voie extrinsèque.....	24
ii. Voie intrinsèque.....	27
f) Régulation de l'apoptose : focus sur la famille Bcl-2	30
i. La famille Bcl-2, de nombreux poids dans la balance	30
ii. Interactions.....	31
iii. Régulation des protéines BH3-only	32
iv. Régulation des protéines anti-apoptotiques Bcl-2, l'exemple de Mcl-1	33
Ubiquitination de Mcl-1	35
Déubiquitination.....	39
Dérégulation de Mcl-1	41
Chapitre 2 : UNC5B comme récepteur à dépendance.....	45

1. Les récepteurs à dépendance, une famille fonctionnelle	45
a) Rôle des récepteurs à dépendance dans le développement et l'homéostasie tissulaire.....	47
b) Les récepteurs à dépendance comme suppresseur de tumeur	48
i. Perte du récepteur dans les cancers	50
ii. Gain de ligand dans les cancers	51
iii. Modification des voies de signalisations pro-apoptotiques	51
c) Des mécanismes communs	52
i. TrkC, celui qui utilise la voie intrinsèque de l'apoptose	54
ii. Patched, celui qui active la caspase 9 différemment.....	55
iii. Les récepteurs UNC5, plusieurs voies dans la même famille	56
2. UNC5B.....	56
a) Netrine-1	56
b) La famille UNC5	59
i. Structure.....	59
ii. Expression et régulation.....	60
iii. Fonction.....	62
Signalisation positive	62
Signalisation négative ou pro-apoptotique	63
iv. UNC5B dans les cancers.....	64
v. Approche thérapeutique	65
Enjeux et objectifs du projet de recherche	67
Approche technique	69
1. Criblage CrispR-Cas9	69
2. CrispR vs SiRNA	73
3. Tests de mort cellulaire	74
Résultats	77
Discussion et perspectives	137
1. Difficultés et limites de l'étude.....	138
2. Considérations mécanistiques.....	141
3. Enjeux thérapeutiques	150
Bibliographie	155
Annexes	174

Liste des abréviations

APAF1	Apoptotic Protease Activating Factor 1
APP	Précurseur amyloïde
BAD	Bcl2-associated agonist of cell death
BAK1	Bcl-2 homologous antagonist/killer
BAX	Bcl-2-associated X protein
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BH	Bcl-2 homology domain
BID	BH3 interacting-domain death agonist
BOK	Bcl-2 related ovarian killer
BTB	Bric-à-brac/Tamtrack/Broad
CAF	Cancer associated fibroblasts
CAND1	Cullin-associated Nedd8-dissociated Protein 1
Cas	CRISPR associated genes
CDON	Cell-adhesion molecule related/ downregulated by oncogenes
c-FLIP	Cellular FLICE-like Inhibitory Protein
COMMD	Copper metabolism MURR1 domain containing
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
CRL	CULLIN-RING-Ligase
DAPK	Sérine/thréonine Death-Associated Protein Kinase
DB	DCCBinding
DCC	Deleted in Colorectal Carcinoma
DD	Death Domain
DED	Death Effector Domain
DISC	Death-Inducing Signaling Complex
DSCAM	Down-syndrome cell adhesion molecule
Eph4A	Ephrin type A receptor 4
ERK	Extracellular signal-Regulated Kinase

FADD	Fas Associated via Death Domain
FAS	FS-7-associated surface antigen
FASLG	FAS ligand
GADD45	Growth Arrest and DNA Damage
GPI	Glycophosphatidylinositol
GSK3 β	Glycogen Synthase Kinase 3 β
HECT	Homologous to E6AP carboxyl terminus
IGFL	Institut de Génomique Fonctionnel de Lyon
IP	Iodure de propidium
JNK	C-Jun N-terminal kinase
LDGC-B	Lymphome diffus à grandes cellules B
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MATH	Meprin and TRAF Homology
MCA	Mort cellulaire accidentelle
Mcl-1	Induced myeloid leukemia cell differentiation protein
MCP	Mort cellulaire programmée
MCR	Mort cellulaire régulée
MDM2	Mouse double minute 2 homolog
MPT	Pore de transition de perméabilité mitochondriale
Mule	Mcl-1 ubiquitin ligase E3
NCCD	Comité de Nomenclature sur la Mort Cellulaire
NGF	Nerve Growth Factor
NRAGE	Neurotrophin Receptor-interacting MAGE homolog
NT-3	Neurotrophin-3
NTR	Netrin-like domain
p75NTR	p75 NeuroTrophin Receptor
PEST	Proline (P), Glutamate (E), Serine (S), Threonine (T)
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PIKE-L	PI 3-Kinase Enhancer

PINK1	PTEN-induced kinase 1
Ptch1	Patched
PUMA	p53-upregulated modulator of apoptosis
RD	Récepteurs à Dépendance
RE	Réticulum endoplasmique
RET	REarranged during Transfection
RING	Really Interesting New Gene
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
RPN1	Ribophorine1
SCF	Skp1, Cul1, F-box-protein
SHH	Sonic HedgeHog
SMAC	Second Mitochondrial-Derived Activator of Caspases
TM	Domaine Transmembranaire
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
Trk	Tropomyosin Receptor Kinase
UNC5H	UNCoordinated 5 Homologs
UNC-6	Uncoordinated-6
UPA	Unc-Pidd-Ankyrins
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis protein
Zu-5	Zona-occludens/Unc-5 homology domain

Liste des figures

Figure 1 : Priming à l'apoptose dans le cancer et en réponse aux BH3 mimétiques	23
Figure 2 : Voie extrinsèque de l'apoptose, exemple des récepteurs de mort TRAILR	26
Figure 3 : Voie intrinsèque de l'apoptose	28
Figure 4 : Interactions entre les membres de la famille Bcl-2.....	32
Figure 5 : Structure de Mcl-1	34
Figure 6 : La machinerie Ubiquitine-Ligase	37
Figure 7 : Structure du complexe CRL3	38
Figure 8 : Membres et structure de la famille des COMMD (issu de Bartuzi et al., 2013)	40
Figure 9 : Les récepteurs à dépendance, une famille fonctionnelle	46
Figure 10 : Les récepteurs à dépendance comme supprimeur de tumeur.	49
Figure 11 : Voie pro-apoptotique du récepteur à dépendance Trk-C.....	54
Figure 12 : Voie pro-apoptotique du récepteur à dépendance Patched	55
Figure 13 : Structure des Nétrines	58
Figure 14 : Expression du récepteur à dépendance UNC5B dans les tissus humains adultes	61
Figure 15 : Modèle d'induction de l'apoptose par le récepteur à dépendance UNC5B.....	64
Figure 16 : Mécanisme du système CRISPR-Cas9	70
Figure 17 : Processus suivi pour la réalisation du criblage CRISPR-Cas9	72
Figure 18 : Evaluation de l'apoptose par analyse du cycle cellulaire, la méthode Sub-G1 ...	75
Figure 19 : Evaluation de la perméabilisation mitochondriale par la méthode JC1	76
Figure 20 : Schéma hypothétique de la mort induite par UNC5B	137
Figure 21 : Schéma hypothétique alternatif de la mort induite par UNC5B.....	143
Figure 22: L'invalidation de COMMD1 ne modifie pas la mort induite par UNC5B.....	144
Figure 23: Analyse ontologique des gènes issues du screening DAVID Bioinformatics Resources 6.8 (Huang et al., 2007).	146
Figure 24: Identification de l'environnement proche du récepteur par biotinylation de proximité	148
Figure 25 : L'invalidation de RPN1 et GADD45B inhibe la mort induite par UNC5B.....	149

Liste des tableaux

Tableau 1 : Liste des principaux BH3 mimétiques actuellement développés Ki : constante d'inhibition ; Kd : constante de dissociation Adapté de (Cerella et al., 2020)	44
---	----

Dans la vie d'un organisme, la mort cellulaire est indispensable. Son action permet de sculpter, réparer ou encore protéger les tissus. Elle fait partie des fonctions essentielles des cellules, au même titre que la division cellulaire ou la production d'énergie. Cette mort cellulaire est génétiquement contrôlée, et des mécanismes de mort cellulaire sont retrouvés tôt dans l'évolution à partir des organismes pluricellulaires les plus simples. Les cellules composant ces structures pluricellulaires partagent un but commun, la survie de l'organisme. Le sacrifice d'une cellule est donc souvent nécessaire à l'accomplissement de cet objectif.

Le fonctionnement de cette mort cellulaire dite « programmée » motive le travail des chercheurs depuis plusieurs dizaines d'années. Cette mort pose des questions de recherche fondamentale, concernant ses mécanismes, ou encore son implication dans l'évolution ou dans le développement et l'homéostasie de l'organisme, mais pas seulement. La mort cellulaire, et en particulier ses dérèglements, est impliquée dans un grand nombre de pathologies, qui font de son étude une priorité. Parmi ces pathologies, celle qui est sans doute la plus connue est le cancer. En effet, la mort cellulaire constitue l'un des premiers mécanismes permettant d'éviter le développement de cancers, en éliminant les cellules proliférant de manière excessive, ou se développant dans des sites non appropriés. L'échappement à ces mécanismes d'apoptose constitue donc, pour le cancer, une étape essentielle à franchir pour se développer. Afin de lutter contre ces pathologies, il est donc nécessaire de mieux comprendre les rouages moléculaires de ces mécanismes, et donc d'apporter des réponses à des questions de biologie fondamentale. C'est l'une de ces questions qui m'anime depuis quatre ans maintenant. Comment le récepteur à dépendance UNC5B parvient-il à provoquer la mort cellulaire ?

Dans ce manuscrit de thèse, nous reviendrons sur la notion de mort cellulaire programmée, en nous attachant plus particulièrement sur l'apoptose et sa régulation. Dans cette partie, nous aborderons les différentes fonctions de cette mort cellulaire, ainsi que ses mécanismes. Dans une deuxième partie, nous introduirons le concept des récepteurs à dépendance, en nous concentrant plus spécifiquement sur le récepteur UNC5B, au centre de mon projet de thèse. Ce socle bibliographique posé, j'aborderai ensuite la stratégie que j'ai adoptée face à cette problématique, puis les résultats obtenus. Nous finirons par une discussion sur ces résultats, ainsi que les enjeux et les perspectives soulevés par mes travaux.

Introduction

Chapitre 1 : Mort cellulaire et Apoptose

1. Mort cellulaire, avec ou sans préméditation ?

Il ne peut pas y avoir de vie sans mort, et les cellules composant nos organismes n'échappent pas à cette règle simple. Bien que les premières observations de mort cellulaire remontent aux découvertes de Carl Vogt en 1842 (Clarke and Clarke, 1996), il a fallu attendre le 20^{ème} siècle pour entendre parler de mort cellulaire programmée, avec les observations de Saunders (Saunders, 1966) ou encore Lockshin (Lockshin, 1969). En effet, si une **mort cellulaire accidentelle (MCA)** peut paraître intuitive, la notion de **mort cellulaire régulée (MCR)**, notamment pendant le **développement** est plus inattendue. Alors que la MCA est causée par des **dégâts physique** (température, fortes pressions) ou **chimique** (détergent, forte variation de pH), la MCR correspond à un **processus génétique** et **biochimique** précis, aboutissant à l'arrêt de l'ensemble des fonctions cellulaires. Contrairement à la MCA qui ne peut pas être modulée par une intervention pharmacologique ou génétique, la MCR peut être modifiée en ciblant ses voies de signalisation. Outre son importance dans le développement de l'organisme, cette fonction cellulaire permet de participer activement à l'équilibre dynamique, ou **homéostasie**, face au vieillissement des tissus et aux contraintes infligées par le milieu extérieur.

Toutefois, il est important de différencier mort cellulaire régulée (MCR) de mort cellulaire programmée (MCP). En effet, la MCR ne survient pas seulement en réponse à des perturbations du microenvironnement ou à des agressions extérieures, mais aussi dans des contextes de développement embryonnaire et post-embryonnaire, d'homéostasie tissulaire et de réponse immunitaire. Dans ces cas de figure, on parle de MCP.

En effet, dans les organismes multicellulaires, la MCP est cruciale dans le développement (Jacobson et al., 1997). Par exemple, chez les vertébrés, la mort cellulaire permet d'éliminer les cellules les moins aptes de l'épiblaste (Claveria et al., 2013). Elle

permettra ensuite de modeler l'embryon en supprimant les cellules superflues, comme lors de la création d'orifices tels que la bouche, l'anus ou le vagin, ou comme lors de la formation des espaces interdigitaux. La MCP intervient aussi lors du développement du système nerveux, éliminant les neurones excédants ou migrants à des positions ectopiques (Fricker et al., 2018).

De plus, tout au long de la vie de l'organisme, la mort cellulaire maintient l'équilibre tissulaire en **contrebalançant la prolifération**, en particulier dans les tissus présentant un renouvellement cellulaire important, tel que l'épithélium intestinal ou le système hématopoïétique. Cette MCR est aussi importante pour le bon fonctionnement du système immunitaire, autorisant l'élimination de cellules dispensables, ou dangereuses car leurs récepteurs antigéniques reconnaissent des cellules du soi. La mort cellulaire intervient aussi à des moments précis de la vie de l'organisme adulte, comme pour la régression mammaire à la suite de l'allaitement chez les mammifères ou pour l'involution du thymus. Elle élimine aussi les cellules présentant un fonctionnement anormal, ou dont le génome est endommagé, exerçant ainsi une fonction de suppression tumorale.

2. Les armes du crime - Classification des différents types de mort cellulaire programmée

Selon le **Comité de Nomenclature sur la Mort Cellulaire** (Nomenclature Committee on Cell Death (NCCD) (Galluzzi et al., 2015)), une cellule est considérée morte lorsque au moins l'un de ces deux critères morphologique ou moléculaire est rempli : (1) La cellule a perdu son intégrité membranaire ; (2) la cellule, noyau compris, s'est fragmentée complètement en corps cellulaires distincts (appelés corps apoptotiques). Ce processus doit être irréversible.

Malgré ces critères précis définissant la mort d'une cellule, il existe de nombreux processus différents pouvant amener la cellule à mourir de manière régulée. Plusieurs tentatives de classification ont donc été réalisées, afin de décrire au mieux ces différents processus. Longtemps basée sur des **critères morphologiques**, notamment à cause de limitations techniques, cette classification s'est ensuite affinée, grâce à une compréhension toujours plus accrue des mécanismes biochimiques sous-jacents. En effet, malgré des

caractéristiques morphologiques communes, certaines MCR peuvent être issues de processus cellulaires complètement différents (Galluzzi et al., 2012).

Ainsi, la première classification formelle différenciait trois types de MCR distinctes : (1) La mort cellulaire de type 1, appelée aussi apoptose, présentant un rétrécissement du cytoplasme, une condensation de la chromatine (pyknosis), une fragmentation du noyau (karyorrhesis), et l'apparition de corps apoptotiques ; (2) La mort cellulaire de type II, ou mort cellulaire autophagique, caractérisée par une importante vacuolisation du cytoplasme ; et enfin (3) la mort cellulaire de type III, ou nécrose, ne présentant ni des caractéristiques apoptotiques ni autophagiques. Cette classification est longtemps restée inchangée, jusqu'à l'arrivée de progrès techniques apportant une meilleure compréhension des **mécanismes biochimiques** impliqués, et complexifiant la vision de la mort cellulaire.

Aujourd'hui, l'apport de connaissances beaucoup plus détaillées des mécanismes de régulation de la mort cellulaire a permis d'identifier une myriade de morts cellulaires régulées différentes. Cette classification est en perpétuelle évolution, à mesure des avancées dans le domaine de la mort cellulaire. Selon le NCCD 2018, on distingue les morts cellulaires suivantes : l'apoptose (intrinsèque, extrinsèque), la nécrose induite par le pore de transition de perméabilité mitochondriale (MPT), la nécroptose, la ferroptose, la pyroptose, le parthanatos, la mort cellulaire entotique, la mort cellulaire NETotic, la mort cellulaire lysosomale, la mort cellulaire autophagique et enfin la mort cellulaire immunogénique (Galluzzi et al., 2018b). Cette classification est toutefois encore débattue. On pourra souligner que certains de ces modes de mort cellulaires ont été mis en évidence sur des modèles très spécifiques, poussés à leur limite, et loin d'une situation physiologique normale.

Dans le chapitre suivant, nous présenterons plus en détail l'apoptose, décrite comme la voie de mort principale des récepteurs à dépendance. Toutefois, il est important de garder en tête la complexité et la grande diversité de ces mécanismes de mort. Dans l'optique de mieux comprendre les mécanismes de mort médiés par UNC5B, il ne faut pas oublier de voir au-delà de cette classification. Si celle-ci permet d'apporter un rationnel et des bases pour décrire la mort cellulaire, les différentes morts cellulaires sont bien souvent interconnectées, et beaucoup moins cloisonnées en réalité.

3. L'Apoptose, le crime parfait

a) Généralités

Le terme apoptose (du grec : *apo*, « au loin » et *ptosis*, « chute »), a été utilisé pour la première fois par Kerr et al (Kerr et al., 1972) pour décrire une mort cellulaire à la morphologie particulière : un **arrondissement de la cellule** accompagné de la **rétractation des pseudopodes**, un **rétrécissement du cytoplasme**, une **condensation de la chromatine** (pyknosis), une **fragmentation du noyau** (karyorrhexis), et un **bourgeonnement de la membrane plasmique** aboutissant à la formation de corps apoptotiques. Toutefois, la membrane plasmique garde son intégrité jusqu'aux dernières étapes du processus, et aucune modification ultra-structurale des organelles n'est à noter. Ces corps apoptotiques sont ensuite rapidement reconnus puis absorbés par les cellules phagocytaires voisines, puis digérées dans leurs lysosomes (Czabotar et al., 2014).

D'un point de vue biochimique, les cellules apoptotiques présentent de nombreuses modifications, tel qu'une **fragmentation de l'ADN, ainsi que le clivage et la réticulation des protéines**. De plus, les cellules apoptotiques seront reconnues par les phagocytes, grâce à l'exposition de molécules particulières à leur surface comme la phosphatidylsérine (Elmore, 2007; Hengartner, 2000).

b) Les caspases, l'assassin efficace

La famille des caspases, **protéases à cystéines** (Cystein ASPartyl proteASE), est l'un des acteurs principaux de ces modifications biochimiques. Ces caspases sont présentes dans la cellule de manière constitutive sous forme **inactive** (procaspase ou zymogène). Dans le cas d'un processus apoptotique, ces caspases sont **clivées et activées**, et peuvent pour la plupart activer en retour d'autres caspases, déclenchant ainsi une cascade d'activation menant à la mort cellulaire. Cette activation post transcriptionnelle permet une régulation fine et rapide de cette enzyme et des mécanismes qui lui sont associés.

D'un point de vue structural, les caspases sont composées d'un peptide à 3 domaines : un pro-domaine N-terminal, une grande sous-unité p20 et une petite sous unité p10. Après clivage au niveau d'un **acide aspartique** (Asp), la procaspase est convertie en forme active.

Une fois activée, la caspase pourra ensuite cliver et activer une autre caspase en retour, ou cliver différents substrats au niveau d'un résidu Asp, et d'un motif spécifique de reconnaissance à quatre acides aminés.

La famille des caspases est divisée en trois groupes principaux, basés sur leurs fonctions biologiques et sur la similarité de leurs séquences (Julien and Wells, 2017):

- Groupe 1 : Formé des caspases 1, 4, 5 et 11, **caspases inflammatoires**
- Groupe 2 : Formé des caspases effectrices 3, 6 et 7, **exécutrices de l'apoptose**
- Groupe 3 : Formé des **caspases initiatrices** 2, 8, 9, 10 et 12

Si la famille des caspases est habituellement associée à des phénomènes pro-apoptotiques et inflammatoires, leur implication dans de nombreux autres processus tels que la différenciation des cellules souches (Li et al., 2010) ou encore le développement neuronal a été mis en évidence (Williams et al., 2006a). Toutefois, les processus par lesquels ces cellules parviennent à activer temporairement ces caspases, puis à les inactiver restent encore très largement méconnus.

L'apoptose a longtemps été opposée à la mort cellulaire nécrotique, par sa capacité à induire une mort tolérogène, ne provoquant pas de réaction immunitaire, notamment grâce à la destruction protéolytique d'épitopes dominant par les caspases (Castiglioni et al., 2002). Depuis, cette dichotomie s'est estompée (Green et al., 2009), et des résultats ont montré que les caspases pourraient participer à l'exposition d'épitopes, en clivant des protéines ancrées au cytosquelette (Rawson et al., 2007).

Bien que l'activation des caspases soit l'une des caractéristiques principales de la mort cellulaire apoptotique, celles-ci ne sont pas strictement nécessaires, et leur inhibition ne font que retarder la mort par apoptose (Galluzzi et al., 2018b). Cependant, les caspases restent un **élément clé facilitateur** de l'apoptose, permettant d'assurer une mort « propre » et rapide, nécessaire pour assurer de nombreuses fonctions physiologiques.

c) Le mobile du crime - Rôle physiologique de l'apoptose

A l'échelle de l'organisme, pouvoir déclencher individuellement la mort des cellules composant les tissus est indispensable pour modeler et maintenir la structure du vivant, en éliminant les cellules endommagées ou superflues.

i. Développement

L'apoptose joue un rôle crucial dans le développement de l'organisme, permettant la **maturation des tissus et organes** nouvellement créés, en éliminant les cellules surnuméraires issues d'une prolifération cellulaire importante. Par exemple, même si la réalisation d'une triple délétion de BAX, BAK et BOK montre que la voie intrinsèque de l'apoptose (définie en Chapitre 1.3.e) n'est pas strictement essentielle au développement des mammifères, celle-ci révèle une mortalité périnatale élevée et des anomalies phénotypiques importantes (Ke et al., 2018). Plus récemment, l'équipe de Satoko Arakawa a montré que la mort cellulaire autophagique pourrait compenser la perte de la voie intrinsèque dans ce type de modèle, laissant à penser que la voie intrinsèque de l'apoptose n'est pas la seule voie de mort impliqué dans le développement (Arakawa et al., 2017).

De manière générale, les **tissus en développement** ont une **sensibilité à l'apoptose plus élevée** comparée à des tissus adultes. Cette corrélation peut en partie s'expliquer par le **facteur de transcription MYC**, qui dirige à la fois l'expression de gènes impliqués dans la prolifération et dans l'apoptose, permettant d'assurer un mécanisme de contrôle en rendant les cellules plus susceptibles à l'apoptose (Sarosiek et al., 2017). Ainsi, le cerveau périnatal se développe à la suite d'une prolifération massive de neurones progéniteurs, suivie directement par l'apoptose d'environ la moitié de ces cellules, se trouvant en excès ou n'ayant pas établi de connexion synaptique correcte (Southwell et al., 2012). Ce phénomène de sensibilisation à l'apoptose dans les tissus en développement se retrouve aussi dans le cœur, le rein ou le foie (Madden et al., 2007), puis disparaît à mesure de la maturation des tissus jusqu'à l'âge adulte. La perte de sensibilité à l'apoptose dans les tissus adultes s'explique probablement par la nécessité d'avoir des cellules non remplaçables sur le long terme, comme par exemple les neurones du cerveau adulte.

ii. Homéostasie

Avec un renouvellement estimé à 60 millions de cellules par seconde, c'est dans le **système sanguin** que le rôle de l'apoptose semble le plus évident. Par exemple, dans le cas des lymphocytes B et T, la double délétion des protéines spécifiques de la voie intrinsèque de l'apoptose BAX et BAK provoque une accumulation de ces cellules (Lindsten et al., 2000). Habituellement, ces lymphocytes sont éliminés par apoptose à la fin de leur durée de vie utile, à la fin d'une infection, ou pendant le processus de maturation dans le thymus où les lymphocytes auto-réactifs sont éliminés. Toutefois, le rôle de l'apoptose dans le maintien de l'homéostasie d'autres organes majeurs reste plus discuté, comme par exemple dans le cas du système gastro-intestinal (Ke et al., 2018).

En revanche, il est clair que l'apoptose est impliquée comme **mécanisme de réparation** lors d'un remodelage important des tissus comme lors de l'involution de la glande mammaire suivant la lactation (Schuler et al., 2016). L'apoptose est aussi utilisée comme **mécanisme détoxifiant** dans le foie, où les hépatocytes accumulant les toxines sont éliminés et relarguent des cytokines permettant de stimuler la prolifération de nouveaux hépatocytes et ce faisant, de régénérer le foie (Luedde et al., 2014).

d) L'homicide involontaire – L'apoptose dans les pathologies

Si l'équilibre apoptotique est primordial pour l'organisme, son dérèglement dans un contexte pathologique occasionne des conséquences dramatiques, que ce soit dans le sens d'un **excès d'apoptose**, ou au contraire d'un **défaut d'apoptose**.

i. Défense contre les pathogènes

En réaction aux infections intracellulaires, l'une des défenses les plus primitives des cellules hôtes est de mourir de manière préventive, afin de **limiter au maximum la réplication et la propagation du pathogène** (Finlay and McFadden, 2006). Cette mort cellulaire est déclenchée à la fois par des mécanismes d'apoptose extrinsèque médiés par le système immunitaire, mais aussi intrinsèque.

Dans certains cas, les bactéries se sont adaptées afin de contourner cette défense de l'hôte. Par exemple, *Mycobacterium tuberculosis* est capable de **stimuler la production de la protéine anti-apoptotique Mcl-1** en activant le récepteur nucléaire PPAR γ (Peroxisome Proliferator Activated Receptor γ) (Sly et al., 2003).

ii. Maladies neurologiques

Bien que lors du développement périnatal du cerveau les cellules présentent une sensibilité accrue à l'apoptose, celles-ci deviennent très majoritairement insensibles à l'apoptose à l'âge adulte, afin d'assurer la **viabilité neuronale à long terme**. Cependant, les protéines associées à l'apoptose peuvent être dérégulées dans des contextes pathologiques associés à une **neurodégénérescence**. En ce sens, on observe une augmentation de l'expression des protéines pro-apoptotiques BAX et BAK dans les neurones de l'hippocampe de la majorité des cerveaux d'individus atteints par la maladie d'Alzheimer (Kitamura et al., 1998). On retrouve aussi un dérèglement de l'apoptose dans d'autres maladies neurodégénératives telles que Parkinson ou la maladie de Huntington, mais aussi dans lésions neurologiques aiguës, comme lors d'ischémies cérébrales (Singh et al., 2019).

iii. Maladies auto-immunes

L'apoptose est très importante pour l'**homéostasie du système immunitaire**, et son dérèglement est donc dramatique pour le bon fonctionnement de celui-ci. Ainsi, une apoptose insuffisante, aussi bien au niveau de la voie extrinsèque (Meynier and Rieux-Laucat, 2019), qu'intrinsèque (définis en Chapitre 1.3.e) est associée à des **maladies auto-immunes**. Concernant la voie intrinsèque, on observe par exemple des niveaux élevés de protéines anti-apoptotiques Bcl-2 dans les lymphocytes B et T du système sanguin périphérique de patients diagnostiqués avec un lupus systémique. La surexpression des membres de la famille BCL-2 serait aussi associée à l'hyper-prolifération des lymphocytes T impliqués dans des maladies auto-immunes gastrointestinales telles que la maladie de Crohn (Ina et al., 1999).

iv. Cancer

L'implication de l'apoptose comme mécanisme de prévention tumorale a été évoquée dès 1972 par Kerr et collègues. Ce mécanisme permettrait d'éliminer les cellules présentant une prolifération excessive, ou se développant dans des sites non appropriés. Depuis, de

nombreuses observations ont montré que **l'évasion à l'apoptose est une étape clé pour l'échappement et la progression tumorale**, et la capacité de supprimer l'apoptose est considérée comme une caractéristique majeure du cancer (Hanahan and Weinberg, 2011).

De nombreux points de contrôle déclenchant la mort cellulaire sont présents dans la cellule pour détecter les stress liés à une hyper-prolifération, une activité oncogénique ou une instabilité génomique, tel que les dommages à l'ADN ou un stress du réticulum endoplasmique. De plus, certains programmes transcriptionnels associés à la prolifération, comme celui orchestré par MYC, assurent aussi un contrôle additionnel en induisant aussi une transcription pro-apoptotique (Sarosiek et al., 2017).

L'apoptose est donc un verrou essentiel, que de nombreux avantages sélectifs permettent de faire sauter pour l'acquisition d'un phénotype tumoral. L'une des adaptations les plus connues pour échapper à l'apoptose est la mutation du suppresseur de tumeur p53, protéine pivot de l'induction de la mort cellulaire, que l'on retrouve mutée dans plus de 50% des tumeurs (Parrales and Iwakuma, 2015). Dans un très grand nombre de tumeurs, en particulier celles résistantes aux thérapies, on constate une augmentation des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2. Il s'agit d'une réponse à la pression sélective imposée par l'apoptose déclenchée par les mutations et le stress rencontrés par la cellule tumorale (Adams and Cory, 2018).

Ces observations mettent en lumière une donnée très importante dans un contexte thérapeutique. Bien que beaucoup de mécanismes senseurs du stress comme p53 sont inactivés dans les tumeurs, les rendant résistantes aux agents cytotoxiques tels que la chimiothérapie, le cœur de la machinerie apoptotique est toujours fonctionnel, ce qui permet d'imaginer des thérapies ciblant directement cette machinerie. Pour cela, il est indispensable de mieux comprendre les éléments la régulant.

Notion de « Priming » à l'apoptose

Le concept de « Priming » est utilisé pour décrire les cellules présentant une **sensibilité accrue à l'apoptose**, dont l'équilibre de la balance entre les protéines anti- et pro-apoptotiques peut basculer facilement vers l'apoptose (Certo et al., 2006; Montero and Letai, 2018).

Généralement, les cellules cancéreuses développent une **dépendance aux protéines anti-apoptotiques de la famille BCL-2** à cause de plusieurs facteurs, comprenant leur tissu d'origine ou l'impact des lésions oncogéniques subit par la cellule. Au cours du processus de transformation tumorale, les mutations et les stress rencontrés par la cellule entraînent une surexpression de protéines BH3-only (Adams and Cory, 2018). Ce phénomène impose une pression sélective favorisant les cellules avec des niveaux de protéines Bcl-2 anti-apoptotiques élevés. Ces niveaux élevés de protéine BCL-2 renforcent l'accumulation de protéines pro-apoptotiques BH3-only, habituellement instables non liées, qui sont stabilisés par leur liaison avec les protéines BCL-2 (Merino et al., 2012).

Intrinsèquement, certains types cellulaires sont d'avantage « primés » que d'autres à l'apoptose. Par exemple, les cellules hématopoïétiques sont très sensibles aux signaux pro-apoptotiques (Sarosiek et al., 2017).

Par conséquent, les cellules tumorales ainsi « primées » sont beaucoup plus réceptives aux voies et stratégies thérapeutiques visant les protéines BCL-2 (**Figure 1**). Ces dernières années, de nombreuses molécules inhibant les membres de la famille BCL-2 ont vu le jour, les **BH3 mimétiques**, exploitant ce concept de « priming » à l'apoptose (Merino et al., 2018).

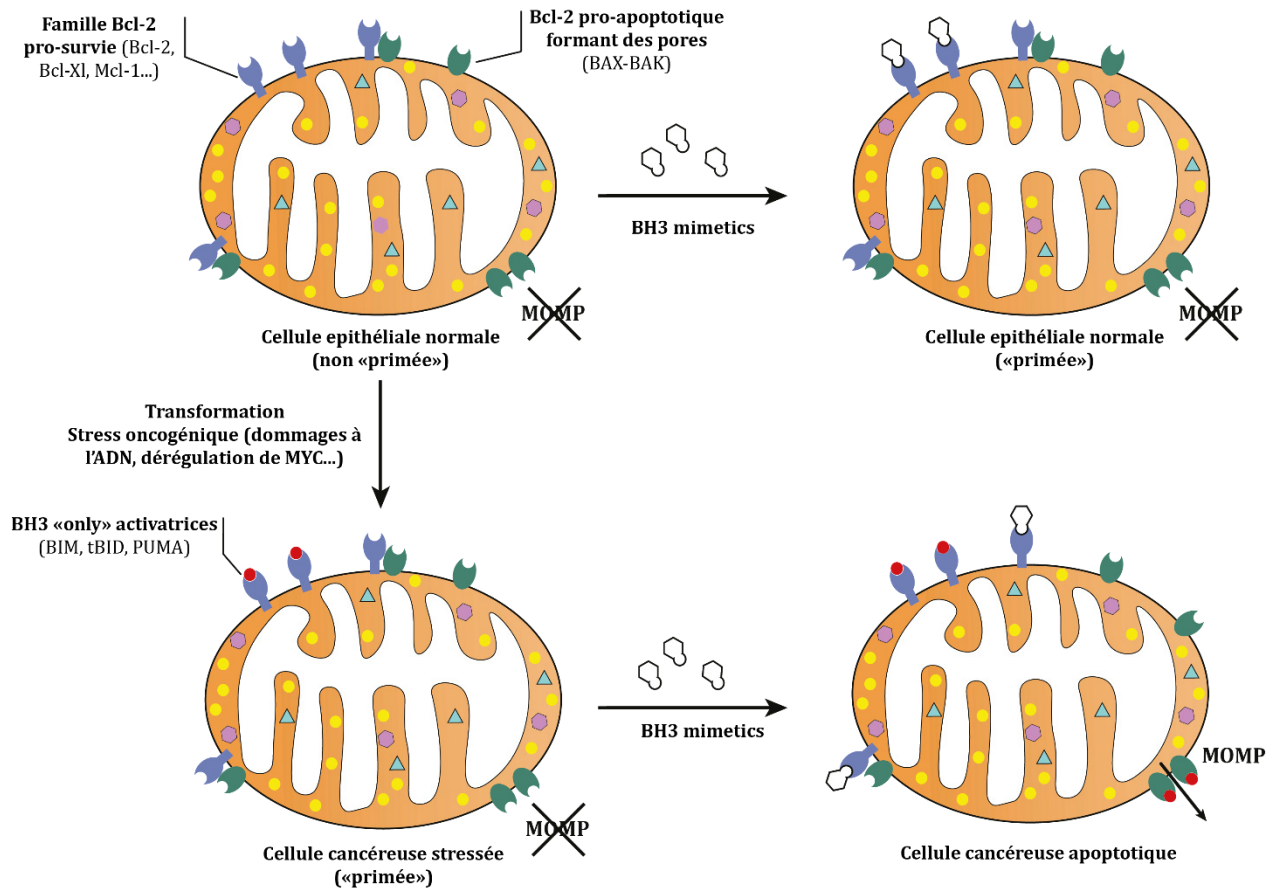


Figure 1 : Priming à l'apoptose dans le cancer et en réponse aux BH3 mimétiques

Pendant le processus de la transformation néoplasique, la cellule est soumise à de nombreux signaux oncogènes, amenant un stress et donc une augmentation de l'expression des protéines pro-apoptotiques. La cellule cancéreuse verra alors ses protéines anti-apoptotiques saturées, et deviendra « primée » pour l'apoptose. Avec un traitement aux BH3 mimétiques, l'apoptose pourra donc être induite dans ces cellules. Les cellules épithéliales non stressées, de leur côté, seront résistantes au traitement grâce à une balance anti-apoptotique plus favorable. MOMP : Perméabilisation de la membrane externe mitochondriale. Adapté de (Singh et al., 2019)

e) Mode opératoire d'un serial killer - principales voies de signalisation

Les mécanismes de l'apoptose sont très complexes, impliquant une cascade d'évènements moléculaires dépendant de l'énergie. A ce jour, la communauté scientifique s'accorde pour séparer l'apoptose en deux voies de signalisations principales : la **voie extrinsèque** (voie des récepteurs de mort) et la **voie intrinsèque** (voie mitochondriale). Cependant, il existe aussi des éléments montrant que ces deux voies de signalisation sont liées, et que des molécules d'une voie peuvent avoir un effet sur l'autre voie (Igney and Krammer, 2002).

i. Voie extrinsèque

La voie extrinsèque de l'apoptose est induite par l'**activation de récepteurs transmembranaires**, à la suite de perturbations du microenvironnement cellulaire (Flusberg and Sorger, 2015). Parmi les plus décrits de ces récepteurs, on trouve le récepteur FAS (aussi appelé CD95 ou APO1) (Wajant, 2002), ou encore la super famille des récepteurs TNF, composé notamment de TNFR, TRAILR1 et TRAILR2.

De manière générale, la fixation du ligand au récepteur impliqué dans la voie extrinsèque permet l'assemblage d'un complexe protéique dynamique au niveau de l'extrémité intracellulaire du récepteur, appelé **DISC** pour « Death-Inducing Signaling Complex ». Ce complexe régulera ensuite l'activation et la régulation de la **caspase 8** (et de la caspase 10 dans certains cas particuliers). Par exemple, dans le cas de FAS et des récepteurs TRAILRs, le ligand associé – FASLG (FAS ligand) et TRAIL, respectivement – stabilise une configuration homo-trimérique des récepteurs, et induit ainsi un changement conformationnel à leur extrémité intracellulaire. Ce changement permet alors l'exposition du domaine de mort (DD), et son association avec la protéine adaptatrice FADD (Fas Associated via Death Domain). Cette association active l'assemblage du DISC en induisant le recrutement, via le DED (Death Effector Domain), de la caspase 8 et de plusieurs isoformes de c-FLIP (Cellular FLICE-like Inhibitory Protein) (Dickens et al., 2012; Fu et al., 2016). L'interaction de la caspase 8 et du DED permet ainsi l'assemblage de filaments linéaires de caspase 8, facilitant son homo-dimérisation et ainsi son activation. c-FLIP, homologue de son

coté, agit comme élément régulateur de ce complexe. En fonction de l'isoforme de c-FLIP présente, l'action sera inhibitrice ou activatrice de la voie de signalisation apoptotique (Fricker et al., 2010; Hughes et al., 2016; Kavuri et al., 2011; Micheau et al., 2002).

L'activation de la caspase 8 est suivie de deux voies de signalisation cellulaire différentes, suivant le type cellulaire impliqué. D'une part, dans les cellules dites « de **type I** » (thymocytes et lymphocytes matures par exemple), la caspase 8 activée va à son tour cliver et activer les caspases exécutrices 3 et 7 et provoquer ainsi la mort cellulaire. Cette MCR ne peut pas être inhibée par la surexpression des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et par la co-invalidation de BAX et BAK, ou la perte de BID (BH3 interacting domain death agonist), ce qui montre que dans ce type de cellules, la voie extrinsèque est **indépendante de la voie mitochondriale** (Barnhart et al., 2003). D'autre part, dans les cellules « de **type II** » (hépatocytes, cellules β du pancréas et dans la majorité des cellules cancéreuses), l'activation directe des caspases 3 et 7 est **empêchée par les XIAP** (X-linked inhibitor of apoptosis protein) (Jost et al., 2009). Dans ces cellules, la voie extrinsèque dépend du **clivage de BID** par la caspase 8 (Li et al., 1998; Luo et al., 1998; Yin et al., 1999), et ainsi de la génération d'une forme tronquée de BID (tBID) qui transloque à la membrane externe de la mitochondrie (Huang et al., 2016). tBID fonctionne ensuite comme une protéine BH3-only (voir sous partie ii), déclenchant la perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie dépendante de BAX/BAK et une MCR médiée par la caspase 9 (**Figure 2**).

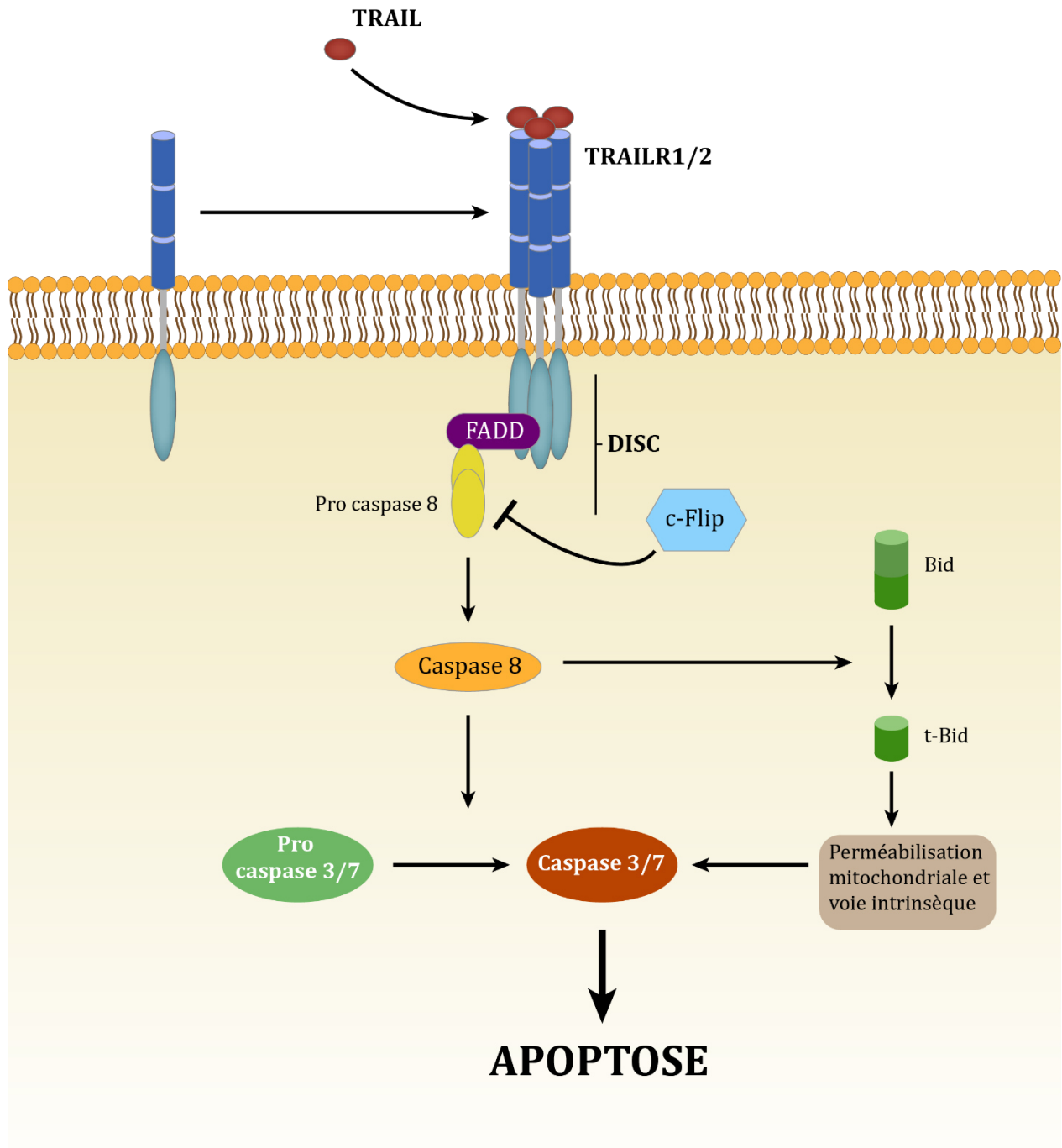


Figure 2 : Voie extrinsèque de l'apoptose, exemple des récepteurs de mort TRAILR

ii. Voie intrinsèque

La voie intrinsèque de l'apoptose est une voie de mort médiée par des **signaux intracellulaires** activés à la suite de différentes **perturbations micro-environnementales**. Parmi ces perturbations, on peut citer les dommages à l'ADN, le stress du réticulum endoplasmique (RE), la surcharge en espèces réactives de l'oxygène (ROS), la déprivation de facteur de croissance, ou encore le stress réplicatif. (Czabotar et al., 2014; Pihan et al., 2017; Roos et al., 2016).

Ces perturbations provoquent l'activation de protéines pro-apoptotiques, les **BH3-only** « **activateurs** » d'apoptose. Dans certains cas de figure, cette activation est transcriptionnelle, comme dans le cas de dommages à l'ADN, ou le facteur de transcription p53 surexprime PUMA (p53-upregulated modulator of apoptosis), une protéine BH3-only. Elle peut aussi se faire à un niveau protéique comme lors du clivage de la forme inactive BID vers la forme active, tronquée, tBID. Ces protéines pro-apoptotiques peuvent interagir et être séquestrés par des **protéines anti-apoptotiques tel que Bcl-2, Bcl-XL ou Mcl-1**, ce qui empêchera leur action pro-apoptotique. Si ces protéines anti-apoptotiques sont déjà saturées ou absentes, les protéines BH3-only peuvent se lier et activer BAX (BCL-2 associated X protein) et/ou BAK (BCL-2 antagonist/killer). Une fois activées, BAX et BAK oligomérisent et forment ainsi des pores permettant la **perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie** (ou MOMP, pour Mitochondria Outer Membrane Permeabilisation). Cela a pour conséquence le relargage de protéines apoptotiques dans le cytoplasme, telles que le cytochrome C, SMAC (Second Mitochondrial-Derived Activator of Caspases) et la protéase à sérine OMI. Dans le cytoplasme, le cytochrome c interagit avec APAF1 (Apoptotic Protease Activating Factor 1) pour former **l'apoptosome**, un complexe protéique servant de plateforme d'activation pour la caspase 9. La caspase 9 activée, à son tour, clive ensuite les caspase effectrices 3 et 7 pour exécuter le processus de mort cellulaire (Singh et al., 2019)(**Figure 3**).

Cette voie de signalisation est finement régulée, notamment au niveau de l'activation des caspases, qui peuvent être inhibées par XIAP, pouvant lui-même être neutralisé par SMAC et OMI, libérées dans le cytoplasme au moment de la MOMP. Malgré tout, cette régulation repose d'abord sur l'équilibre entre les éléments pro-apoptotiques (BAX/BAK et les

protéines BH3-only) et anti-apoptotiques (parmi lesquels Bcl-2, Bcl-XL et Mcl-1). Le niveau protéique de ces différents éléments est maintenu par une régulation complexe, aussi bien à un niveau transcriptionnel (Miyashita and Reed, 1995; Zong et al., 1999) que post traductionnel (Kale et al., 2018), en particulier grâce à la voie de dégradation ubiquitine dépendante.

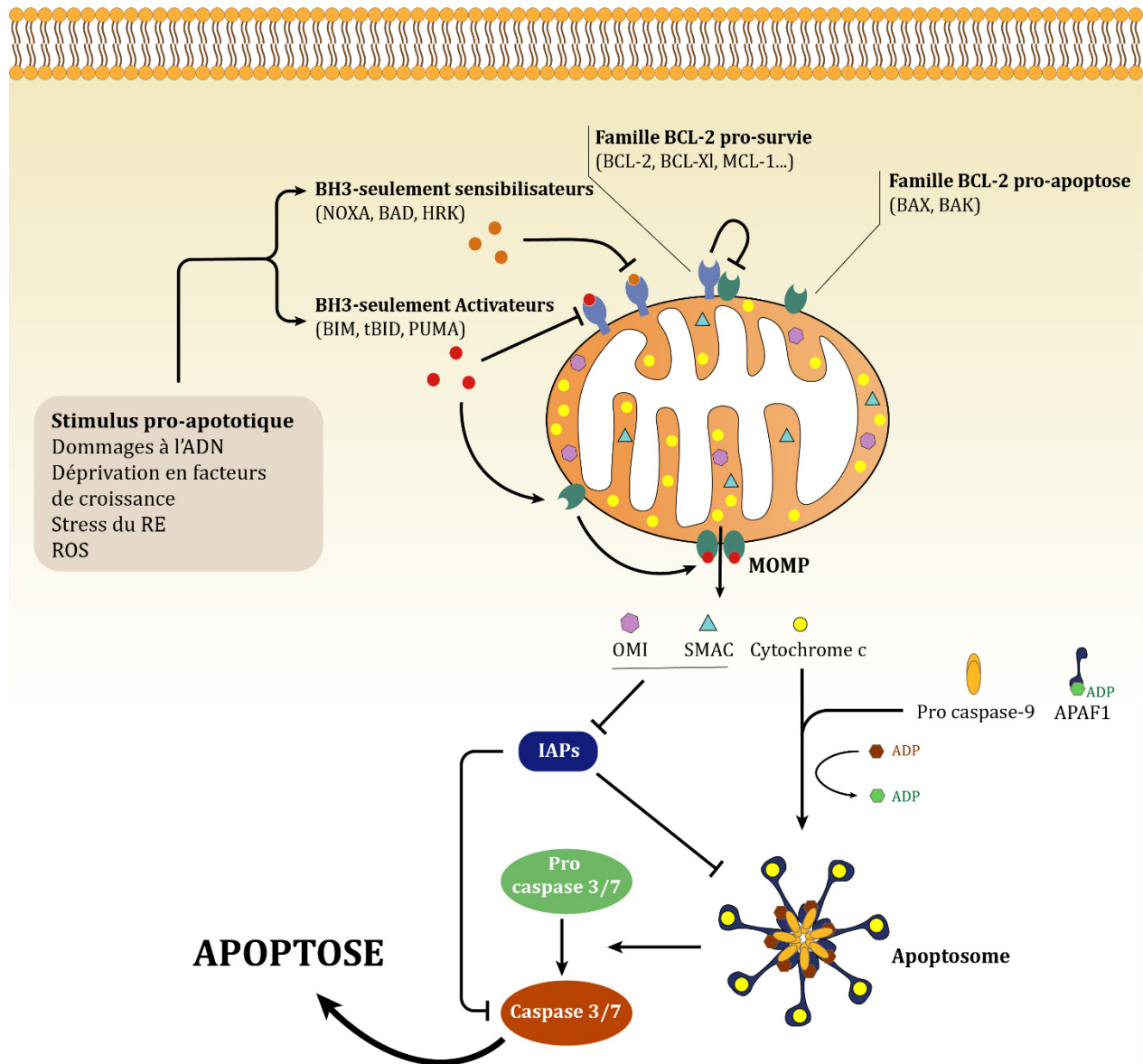


Figure 3 : Voie intrinsèque de l'apoptose

Ces deux voies de signalisation nous montrent que les voies de mort ne sont pas si distinctes, qu'elles sont interconnectées et imbriquées. Lorsque l'on tente de décrypter un processus de mort donné, comme c'est le cas dans mon projet de thèse, il est important de regarder les voies de morts dans leur ensemble et non pas de se cantonner à un concept et aux voies de signalisation établies.

f) Régulation de l'apoptose : focus sur la famille Bcl-2

De nombreux acteurs et processus sont impliqués dans la régulation des voies d'apoptoses, qu'elles soient extrinsèques ou intrinsèques. L'apoptose peut par exemple être régulée de manière transcriptionnelle, comme c'est le cas avec p53 et son inhibiteur MDM2 (mouse double minute 2 homolog), ou même par des cellules immunitaires, tel qu'on peut l'observer pour la voie du granzyme B. Ces voies étant trop nombreuses et complexe pour être abordées ici, nous nous concentrerons sur les éléments de régulation impliqués dans ce projet de thèse, les membres de la famille Bcl-2.

Comme très souvent dans le domaine du vivant, tout est affaire d'équilibre, et du maintien ou non de cet équilibre dépendra le sort de la cellule. Cette balance apoptotique est composée d'une part des **protéines pro-apoptotiques** BAX, BAK, BOK, et de la famille des BH3-only, et d'autre part des **protéines anti-apoptotiques** de la famille Bcl-2. Dans cette sous-partie, nous ferons un focus sur les différents mécanismes agissant sur l'équilibre de cette balance en régulant la famille Bcl-2.

i. La famille Bcl-2, de nombreux poids dans la balance

L'ensemble des membres de cette balance appartiennent à la famille des Bcl-2, elle-même divisée en trois groupes, basés sur leur fonction : (1) les protéines anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W, Mcl-1, BFL-1/A1), (2) les protéines pro-apoptotiques formant des pores (BAX, BAK et BOK) et (3) les protéines BH3-only (BAD, BID, BIK, BIM, NOXA, PUMA, etc.) (Juin et al., 2013). Structurellement, ces protéines partagent la présence de **domaines BH** (BCL2 Homology domain), permettant les interactions de ces différentes protéines entre elles. Il existe 4 domaines BH différents, et seul le domaine BH3 est partagé par tous les membres de la famille. Si les protéines de la famille BH3-only, comme leur nom l'indique, ne présentent que ce type de domaine, les protéines anti-apoptotiques et les protéines formant des pores présentent l'ensemble de ces 4 domaines. Cette particularité leur permet d'adopter une structure tertiaire très conservée, formant un sillon hydrophobe de liaison au domaine BH3, agissant comme récepteur pour les domaines BH3 des autres membres de la famille (Kale et al., 2018).

ii. Interactions

Chacun de ces partenaires interagit de manière préférentielle entre eux, ajoutant un niveau de complexité et de subtilité à cet équilibre pro/anti apoptotique. Ainsi, les protéines BH3-only BID, BIM et PUMA, interagissent et activent BAX et BAK, mais interagissent aussi avec les protéines anti-apoptotiques Bcl-2, parfois même de manière plus spécifique. Ces protéines anti-apoptotiques ont donc un **effet titrant** sur les protéines BH3-only activatrices, **empêchant leur action**, constituant ici un premier niveau d'inhibition. Par exemple, tBID interagit avec BAX avec une constante de dissociation de 25nM en présence de membrane, mais son interaction est encore plus forte avec Bcl-xL, avec une constante de dissociation de 3nM (Kale et al., 2018). L'activation de BAX par tBID ne sera donc efficace qu'une fois les sites BH3 des protéines Bcl-XL saturés. Cet effet peut être modulé par l'intervention des protéines **BH3-only sensibilisatrices**, incapables d'activer BAX et BAK, mais pouvant saturer les protéines anti-apoptotique Bcl-2, et donc faire pencher la balance vers l'apoptose. A un deuxième niveau d'inhibition, les protéines anti-apoptotiques Bcl-2, lorsqu'elles ne sont pas saturées par les protéines BH3-only, peuvent aussi interagir directement avec BAX et BAK, et empêcher ainsi leur oligomérisation et l'induction de l'apoptose (**Figure 4**).

Ces affinités entre les différents groupes de la famille Bcl-2 peuvent aussi varier selon leurs membres. Notamment, NOXA se lie préférentiellement à Mcl-1, avec des constantes d'affinités bien moindre à Bcl-2 et Bcl-XL (Kale et al., 2018). Ainsi, le poids de chacun des partenaires dans la balance pourra varier en fonction des autres partenaires présents, car certains seront bloqués plus efficacement que d'autres.

Ce système d'interaction entre protéines inhibitrices et activatrices constitue donc un verrou complexe dont les composants eux-mêmes sont régulés à plusieurs niveaux

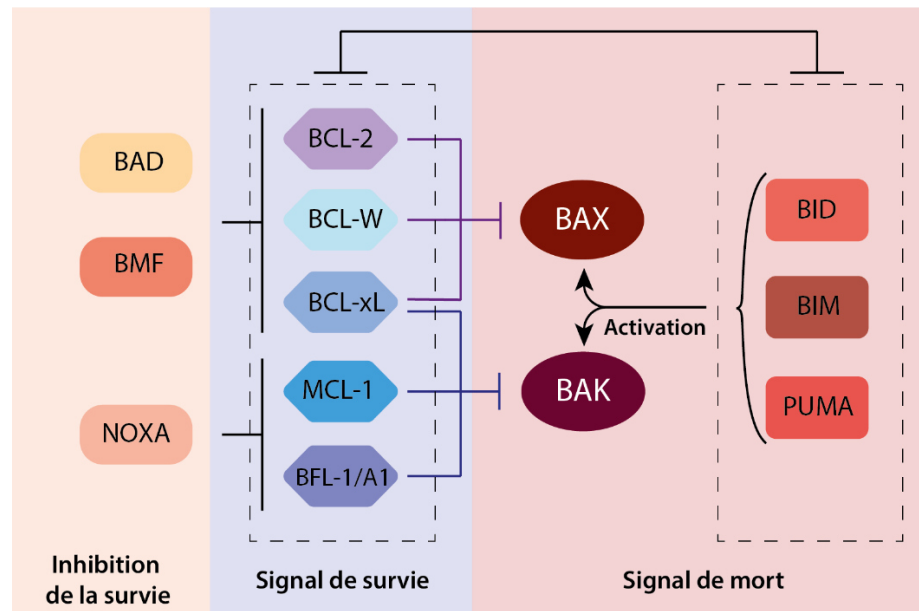


Figure 4 : Interactions entre les membres de la famille Bcl-2

(adapté de (Juin et al., 2013))

iii. Régulation des protéines BH3-only

L'activité des protéines BH3-only est régulée à plusieurs degrés. Le niveau basal des protéines BH3-only est très bas, voire indétectable par la plupart des méthodes. Sous l'effet de différents stress et processus apoptotiques, la **transcription** des protéines BH3-only est activée par le biais de facteurs de transcription spécifiques. Parmi les facteurs de transcription impliqués, on peut citer p53 pour NOXA et PUMA, FOXO3a et CHOP pour BIM et PUMA, ou encore HIF-1 α pour NOXA et Bnip3 (Lomonosova and Chinnadurai, 2008).

Le niveau intracellulaire des protéines BH3-only est ensuite régulé par une panoplie de **modifications post-traductionnelles**. Ces protéines peuvent être ubiquitinées et dégradées par le protéasome, inhibant ainsi leur potentiel pro-apoptotique (Gupta et al., 2018). La phosphorylation des protéines BH3-only peut, selon les cas, provoquer leur activation ou leur inhibition. La phosphorylation de BAD provoque l'inhibition de son activité pro-apoptotique (Zhou et al., 2000), alors que la phosphorylation de BIK améliore son interaction avec les protéines anti-apoptotiques, augmentant ainsi son activité pro-apoptotique (Verma et al., 2001). S'ajoutent à ces mécanismes d'autres modifications portant sur la conformation et la structure protéique des BH3-only, tel que le clivage de BID par la caspase-8, menant à la forme activée tBID (Li et al., 1998).

iv. Régulation des protéines anti-apoptotiques Bcl-2, l'exemple de Mcl-1

De façon similaire, les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 sont finement régulées, à de nombreux niveaux, car le moindre déséquilibre peut déterminer la vie ou la mort de la cellule. Pour illustrer cette régulation, nous prendrons pour exemple la protéine Mcl-1, qui a fait l'objet de nombreuses études, et qui est un élément central de mon projet.

L'expression du gène Mcl-1 est contrôlée au niveau **transcriptionnel, post-transcriptionnel et traductionnel**, et la protéine elle-même fait l'objet de nombreuses **modifications post-traductionnelles** permettant de contrôler sa stabilité et sa dégradation (Senichkin et al., 2020).

Au niveau transcriptionnel, Mcl-1 est régulé par différentes **cytokines et facteurs de croissance** agissant sur plusieurs programmes transcriptionnels induisant Mcl-1, tel que la voie des MAP kinases ou la voie PI3/Akt. A contrario, le facteur de transcription E2F1 est décrit pour réprimer le promoteur de Mcl-1 (Mojsa et al., 2014). La transcription de Mcl-1 est notamment modulée à la suite de stress cellulaires comme l'hypoxie ou le stress du réticulum endoplasmique.

A un deuxième degré de régulation, **l'épissage des pre-ARNm et la régulation des niveaux d'ARNm** permettent un contrôle post-transcriptionnel de l'expression de Mcl-1. L'ARNm de Mcl-1 peut être épissé en deux formes alternatives de Mcl-1 (Mcl-1_S et Mcl-1_{ES}). Ces deux formes, à la différence de la forme totale, seraient en capacité d'induire la mort cellulaire mitochondriale, en se liant à la forme totale de Mcl-1 (Cui and Placzek, 2018). L'ARNm est ensuite régulé de manière très stricte par plusieurs protéines de liaison à l'ARN, par des microARN ainsi que par des longs ARN non codant (LncARN). Ces nombreux points de régulation confèrent à l'ARNm de Mcl-1 une demi-vie très courte (2 à 3h) (Senichkin et al., 2020). A ce jour, pas moins de 13 microARN et 12 LncARN ciblant Mcl-1 ont été décrit.

De plus, Mcl-1 est une protéine efficacement régulée par les **facteurs d'initiation de la traduction**. Le niveau intracellulaire de Mcl-1 est donc dépendant de nombreux stress ciblant la cellule, convergeant vers la phosphorylation de eIF2, et aboutissant à un blocage général de la traduction (Fritsch et al., 2007).

La structure particulière de l'extrémité N-Ter de Mcl-1 comporte de nombreuses caractéristiques permettant plusieurs possibilités de **régulations post-traductionnelles (Figure 5)** (Mojsa et al., 2014). Deux sites caspases, Asp127 et Asp157, permettent le clivage de la protéine par les caspases ou le granzyme B pendant le processus apoptotique, amplifiant le signal de mort initial (Han et al., 2005; Herrant et al., 2004). La partie N-Ter de Mcl-1 arbore aussi des sites **PEST** (Proline (P), Glutamate (E), Serine (S), Threonine (T)) caractéristiques de protéines rapidement dégradées, et soumises à une régulation intensive (Kozopas et al., 1993). Au niveau de ces sites PEST, on retrouve de nombreux sites de **phosphorylation** potentiels. Plusieurs combinaisons d'états de phosphorylation existent donc, aboutissant à différents résultats pouvant être pro- ou anti-apoptotiques. La kinase ERK (Extracellular signal-Regulated Kinase) est notamment connue pour phosphoryler le site Thr163, ce qui a pour effet de stabiliser Mcl-1 (Domina et al., 2004). A l'inverse, la phosphorylation de Mcl-1 par la kinase GSK3 β (Glycogen Synthase Kinase 3 β) a pour conséquence de diminuer l'affinité de Mcl-1 pour ses partenaires pro-apoptotiques, menant donc à l'apoptose (Tong et al., 2018). Parfois, la phosphorylation de Mcl-1 peut mener directement à sa dégradation, lorsque les sites Thr163, Thr92, Ser121 et Ser159 sont phosphorylés, grâce à l'action de la **machinerie des ubiquitines ligases** (Ding et al., 2007; Maurer et al., 2006).

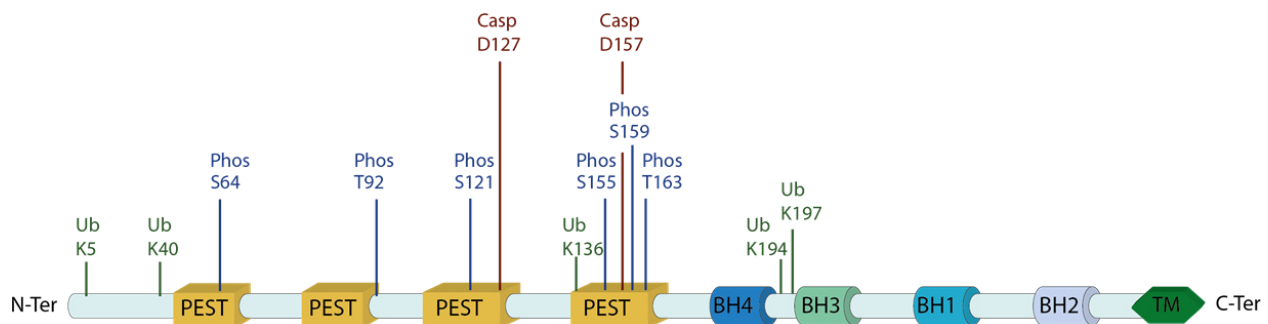


Figure 5 : Structure de Mcl-1

Ub : Site d'ubiquitination ; *Phos* : site de phosphorylation ; *Casp* : site de cleavage caspase ; *TM* : Domaine Transmembranaire

Ubiquitination de Mcl-1

Cette machinerie des ubiquitines ligases tient une place très importante dans la régulation de Mcl-1, assurant un turnover permanent de la protéine, et permettant la dégradation de Mcl-1 à la suite de différents stimuli (Mojsa et al., 2014). Cette machinerie met en jeu une chaîne enzymatique **liant de façon covalente une chaîne d'ubiquitine à Mcl-1**. Lorsque les lysines sont reliées au niveau de leur résidu **K48**, cette chaîne signale spécifiquement l'envoi de la protéine vers une dégradation par le protéasome. Plusieurs enzymes, **des ubiquitines ligases et déubiquitinases**, sont décrites à ce jour comme étant impliquées dans la dégradation de Mcl-1.

Mule

Mule, pour « Mcl-1 ubiquitin ligase E3 » est la première E3 ubiquitine ligase ciblant Mcl-1 à avoir été identifiée (Zhong et al., 2005). Cette enzyme appartient à la sous famille des E3 à domaine HECT, et possède la particularité de présenter un domaine BH3 dans sa structure, lui permettant d'interagir avec Mcl-1, mais pas avec les domaines de Bcl-2 et Bcl-xL. Toutefois, cette interaction est bien moins forte que l'interaction liant Mcl-1 aux protéines BH3-only. Bim, en interagissant avec Mcl-1, empêche son interaction avec Mule et donc sa dégradation (Warr et al., 2005). A l'inverse, NOXA, va favoriser l'interaction entre Mcl-1 et Mule, tout en inhibant l'interaction entre Mcl-1 et la déubiquitinase USP9X. NOXA et Mule, conjointement, vont donc permettre la dégradation de Mcl-1 (Gomez-Bougie et al., 2011).

MARCH5

NOXA a aussi été décrit récemment comme induisant la dégradation de Mcl-1 avec le concours d'une autre ubiquitine ligase, MARCH5. Il s'agit d'une E3 ligase à domaine RING finger ayant la particularité d'être une protéine transmembranaire mitochondriale (Shiiba et al., 2020), impliquée dans la fission mitochondriale, le contrôle de l'intégrité de la mitochondrie et la mitophagie. En 2016, des premières observations ont révélé que l'inactivation de MARCH5 réduit l'ubiquitination et la dégradation de Mcl-1 (Subramanian et al., 2016). Par la suite, différents groupes ont pu démontrer la dégradation de Mcl-1 par l'action combinée de MARCH5 et NOXA (Arai et al., 2020; Haschka et al., 2020), avec l'implication possible de MTCH2, une protéine de la membrane externe mitochondriale, et de l'E2 ligase UBE2K (Djajawi et al., 2020).

La machinerie ubiquitine-protéasome

L'ubiquitination et la dégradation des protéines est dirigée par le **système ubiquitine-protéasome**, nécessaire à la prolifération cellulaire, la régulation de la transcription ainsi qu'à l'apoptose. Ce système fait intervenir une **cascade enzymatique (Figure 6)**, aboutissant à la **liaison covalente d'une chaîne d'ubiquitine** sur la protéine cible, la dirigeant vers sa dégradation par le protéasome (Gupta et al., 2018).

Ce processus commence par l'**activation ATP dépendante** de l'ubiquitine, un peptide de 76aa, par l'**enzyme E1**. Les deux protéines sont alors liées par un lien thioester, puis l'ubiquitine est transférée sur une deuxième enzyme, une **enzyme de conjugaison de l'ubiquitine E2**. La dernière étape de cette chaîne consiste alors au transfert de l'ubiquitine sur une ubiquitine ligase E3, qui catalyse la liaison de l'ubiquitine au substrat en formant une liaison isopeptide entre la glycine en C-ter de l'ubiquitine et le groupe ϵ -NH₃ d'une lysine interne du substrat. Ce processus se répète ensuite, aboutissant à la liaison de nouvelles ubiquitines sur le substrat ou directement sur un résidu lysine de l'ubiquitine précédente, résultant généralement en la formation d'une chaîne d'ubiquitine. Lorsque les ubiquitines sont fixées entre elles au niveau de leur résidu **Lys48** ou du résidu **Lys11**, ce processus conduit à la **dégradation** de la protéine par le protéasome. Les chaînes d'ubiquitinations se lient aux résidus **Lys63**, au résidu **Lys en N-ter** et formant une chaîne dite linéaire, et dans certains cas, au résidu Lys11 vont permettre la **formation de complexes** avec d'autres protéines partenaires, impliquant l'induction de voies de signalisations.

Il existe deux classes majeures d'ubiquitines E3, basées sur la manière dont elles transfèrent l'ubiquitine de l'enzyme E2 sur le substrat. D'une part, les E3 possédant un domaine catalytique **HECT** (homologous to E6AP carboxyl terminus) créent un état catalytique intermédiaire où l'ubiquitine est transférée sur leur résidu cystéine, avant son transfert sur le substrat (Huibregtse et al., 1995). D'autre part, la famille des E3 de type **RING** (Really Interesting New Gene) transfère directement l'ubiquitine au substrat (Lorick et al., 1999). Les E3 de type RING peuvent être composées d'une ou plusieurs sous-unités. Dans ce travail de thèse, nous nous concentrerons sur le complexe CULLIN3-RBX1, une CULLIN-RING-Ligase (CRL) de la classe des E3 RING.

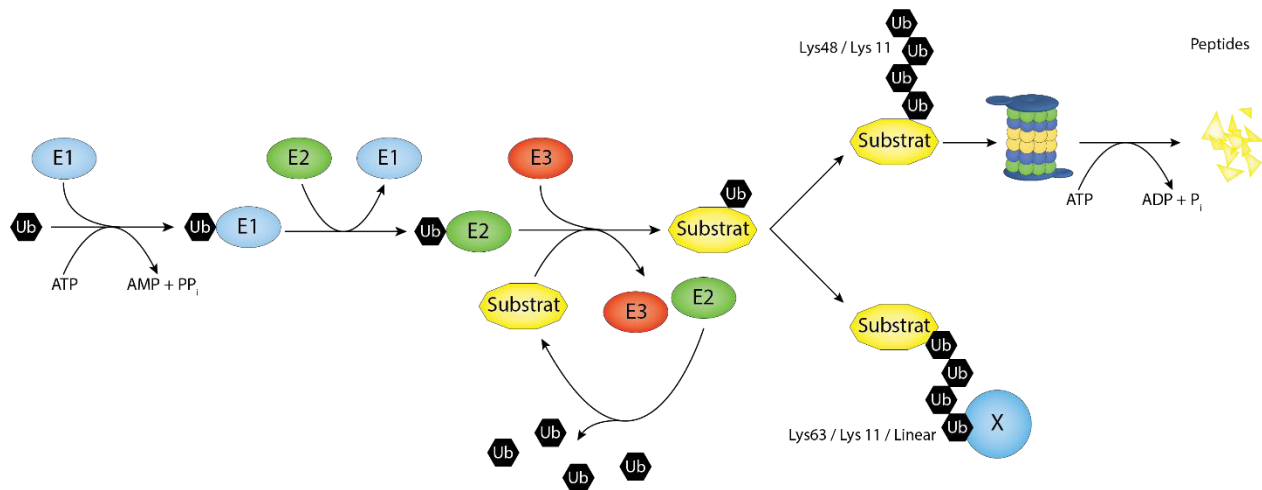


Figure 6 : La machinerie Ubiquitine-Ligase

Parkin

La voie canonique de l'E3 ligase RBR et de PINK1 (PTEN-induced kinase 1) permet normalement le renouvellement des mitochondries dysfonctionnelles ou légèrement dépolarisées, sans induction de l'apoptose. Lorsque la dépolarisation est trop importante, Parkin ubiquitine et dégrade Mcl-1, permettant l'induction de l'apoptose (Carroll et al., 2014).

SCF

Comme nous l'avons décrit plus haut, la phosphorylation de Mcl-1 peut mener à son ubiquitination et à sa dégradation. Plusieurs E3 ubiquitines ligases nécessitent la phosphorylation de différents sites par GSK-3 au préalable, dont SCF^{β-TrCP}, SCF^{FBXO4} et SCF^{FBW7} (Senichkin et al., 2020). SCF (Skp1, Cul1, F-box-protein) est une E3 ligase composée de plusieurs protéines, dont une protéine F-box interchangeable, dédiée à la reconnaissance du substrat. Les protéines de cette famille peuvent agir de manière redondante, comme cela a été démontré pour SCF^{β-TrCP} et SCF^{FBW7}, où l'invalidation des deux E3 ligases est nécessaire pour abolir l'effet d'un inhibiteur d'Akt, API-1, sur la dégradation de Mcl-1 (Ren et al., 2013).

Complexe CRL3

Représentant la plus grande famille des ubiquitines ligase E3, les complexes d'ubiquitination Cullin-RING ligases (CRL) sont assemblés autour de la protéine d'échafaudage **culline**. Chacune des sept Cullines (CUL1, CUL2, CUL3, CUL4A, CUL4B, CUL5 et CUL7) peut former différents complexes dans les cellules humaines (CRL1, CRL2, CRL3, CRL4A, CRL4B, CRL5 et CRL7 respectivement) (Lydeard et al., 2013). Chaque Culline est directement associée en C-terminal avec la protéine **RBX1 ou 2** (protéines RING-H2-domain) qui assure l'interaction avec l'enzyme E2 et qui catalyse le transfert de l'ubiquitine sur le substrat (**Figure 7**).

Dans le cas des ligases E3 Cullines (CRL3), seul RBX1 est décrit pour s'associer avec la Cullin-3. En N-terminal, la Cullin-3 se lie avec **une protéine BTB** (Bric-à-brac/Tamtrack/Broad), qui garantit l'interaction avec le substrat et qui apporte la spécificité de l'ubiquitination (Jerabkova and Sumara, 2019). Le domaine BTB permet la liaison de la protéine BTB à la Cullin-3, alors que la reconnaissance du substrat est assurée par un domaine d'interaction contenant les domaines MATH (Meprin and TRAF Homology) et Kelch. Environ 200 protéines contenant un domaine BTB ont été identifiées chez l'homme, et 53 ont été décrites pour leur interaction avec la Cullin-3, illustrant la grande diversité de signalisations possibles (Bennett et al., 2010). Comme d'autres CRL, les CRL3 E3 ligase sont activées par liaison covalente d'une protéine **NEDD8** (Enchev et al., 2015)

Les rôles identifiés du CRL3 sont donc très variés, allant du contrôle du cycle cellulaire à l'apoptose, en passant par le trafic de protéines (Cheng et al., 2018).

La régulation des CRL est complexe, et fait intervenir des partenaires dont certains encore peu connus. Dans notre projet, nous nous sommes intéressés à l'un de ces partenaire possible, **COMMD2**, que nous décrivons plus en détail dans le prochain encadré.

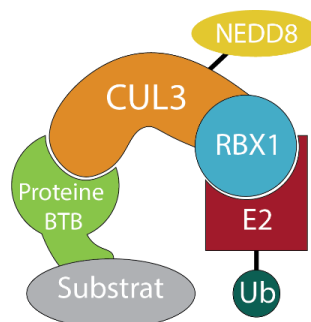


Figure 7 : Structure du complexe CRL3

Trim17

Trim17 appartient à la famille TRIM, l'une des plus grandes familles de ligase E3 ubiquitine unique à domaine RING. En plus de ses rôles possibles dans la régulation de la prolifération cellulaire, Trim17 serait nécessaire et suffisant à l'induction de l'apoptose dans les neurones (Mojsa et al., 2014). A l'instar des ubiquitines ligases SCF, Trim17 nécessite une phosphorylation de Mcl-1 par GSK3 au préalable pour déclencher sa dégradation et l'apoptose dans des neurones granulaires du cervelet (Magiera et al., 2013).

APC/C^{Cdc20}

Plusieurs études mettent en lumière l'importance de la dégradation de Mcl-1 dans le contexte d'un arrêt mitotique prolongé (Senichkin et al., 2020). Si le rôle des ubiquitines ligase MULE et SCF^{FBW7} est encore discuté dans ce contexte (Sloss et al., 2016), l'implication de APC/C, une E3 RING ligase à plusieurs sous-unités, tend à se confirmer (Allan et al., 2018). Après traitement avec un poison des microtubules, induisant l'arrêt mitotique, APC/C dégrade Mcl-1, en agissant de concert avec Cdc20 ; un co-activateur permettant la reconnaissance du substrat.

Déubiquitination

La déubiquitination est le **processus inverse de l'ubiquitination**, qui contrebalance l'action des E3 ligase. Plusieurs déubiquitines ligases ont été identifiées dans ce processus qui permet la **stabilisation** de Mcl-1, incluant USP9X, USP13, USP24, JOSD1, DUB3 et Ku70 (Senichkin et al., 2020). Au même titre que les kinases et les E3 ligases, ces déubiquitinases sont très intimement reliées au complexe réseau régulant les niveaux protéiques de Mcl-1. Par exemple, la première déubiquitinase à avoir été identifiée, USP9X, interagit de manière relativement faible avec Mcl-1 en comparaison à d'autres protéines de la famille Bcl-2, telle que NOXA (Schwickart et al., 2010). Ainsi, la surexpression de NOXA diminue l'interaction entre USP9X et Mcl-1, favorisant l'ubiquitination de ce dernier, sa dégradation et donc l'apoptose (Gomez-Bougie et al., 2011 ; Yan et al., 2014). La phosphorylation des résidus Ser155, Ser 159 et Thr163 empêche aussi l'interaction avec USP9X, et déstabilise la protéine (Schwickart et al., 2010).

COMMD2

COMMD2 est une protéine de 199aa, appartenant à la famille des **protéines COMMD** (copper metabolism MURR1 domain containing). Il s'agit d'une famille **très conservée** chez les eucaryotes, exprimée de façon **ubiquitaire**, et impliquée dans une grande diversité de processus cellulaires (Bartuzi et al., 2013). Le domaine COMM, présent en C-ter de tous les membres de la famille, permet l'interaction des protéines COMMD entre elles, et avec leurs partenaires potentiels (**Figure 8**). A l'exception de COMMD1, décrit pour son implication dans la régulation de NF-kB (Bartuzi et al., 2013), sa participation au métabolisme du cuivre (Tao et al., 2003), ou encore son rôle dans l'adaptation à l'hypoxie (van de Sluis et al., 2007), les autres membres de la famille sont très peu décrits, et aucune publication ne traite directement de COMMD2.

Plusieurs des membres de cette famille ont été décrit dans des contextes tumoraux : COMMD1, COMMD5 et COMMD10 semblent promouvoir des mécanismes anti-tumoraux, alors que COMMD7 semble pro-tumoral (Yang et al., 2019).

Tous les membres de cette famille ont la **capacité à s'associer avec différentes Cullines** (Mao et al., 2011). COMMD1, en interagissant avec le CRL, aurait la capacité de déplacer CAND1 (Cullin-associated Nedd8-dissociated Protein 1), un inhibiteur du CRL, provoquant ainsi la neddylation et l'activation de ce complexe. Dans cette étude, les auteurs démontrent que COMMD2 interagit avec principalement avec la Cullin-3.

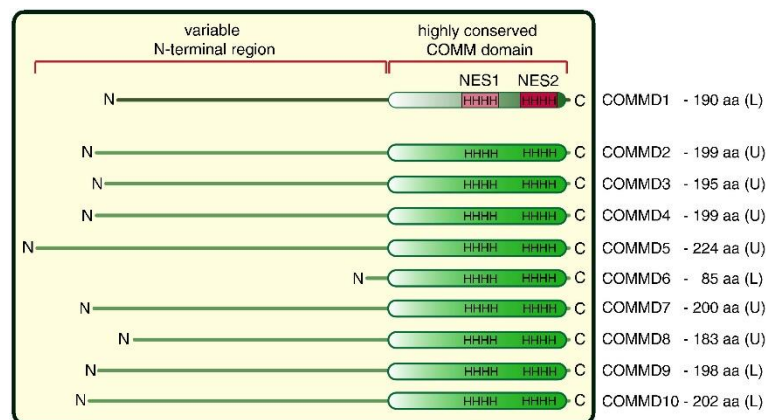


Figure 8 : Membres et structure de la famille des COMMD (issu de Bartuzi et al., 2013)

Tous ces acteurs travaillent donc de concert et de façon étroitement liée pour réguler les niveaux intra-cellulaires de Mcl-1, mais ce système peut rencontrer des dysfonctionnements...

Dérégulation de Mcl-1

Comme vu précédemment, les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 favorisent la survie tumorale, le dérèglement de leur régulation menant à leur surexpression est donc fréquent. Mcl-1, en particulier, est l'un des gènes les plus **amplifié dans les cancers humains** (Beroukhim et al., 2010), et son expression est souvent associée aux **résistances** aux chimiothérapies et aux rechutes (Wei et al., 2006; Wulleme-Toumi et al., 2005). La surexpression de Mcl-1 tient par exemple un rôle primordial dans le développement et la maintien de leucémies myéloïdes aigues (Glaser et al., 2012), et accélère la lymphomagénèse induite par myc (Campbell et al., 2010). L'amplification de Mcl-1 peut provenir **d'insertion de courtes séquences spécifiques** au sein de son promoteur, qui corrèle avec l'augmentation de l'expression de Mcl-1, et un mauvais pronostic dans le cas de leucémies lymphocytiques chroniques (Moshynska et al., 2004). A un niveau génique, les dérégulations de Mcl-1 proviennent généralement d'**amplifications du gène**, et non de translocations de gènes ou de mutations ponctuelles (Fernandez-Marrero et al., 2016; Forbes et al., 2017).

Les mécanismes de phosphorylation et d'ubiquitination constituent un autre ensemble de voies de signalisation dont la cellule tumorale peut abuser pour déréguler les niveaux d'expression de Mcl-1. Par exemple, les **phosphorylations aux sites Thr92 et Thr163**, stabilisant Mcl-1, sont impliquées dans la **résistance acquise** par des lignées de leucémie lymphoblastique aigues au traitement ABT-737 (ciblant Bcl-2 et Bcl-xL) (Mazumder et al., 2012). Parmi les ubiquitines ligases, une **diminution de l'expression de FBW7** corrèle avec l'accumulation de Mcl-1 et un mauvais pronostic dans les cancers du pancréas (Ishii et al., 2017). A l'inverse, une **augmentation de l'expression de la déubiquitinase USP9X** corrèle avec l'augmentation des niveaux de Mcl-1 dans des cancers du côlon ou encore dans des lymphomes folliculaires (Peddaboina et al., 2012; Schwickart et al., 2010).

Les moyens permettant à la cellule cancéreuse d'augmenter les niveaux intracellulaires de Mcl-1 sont nombreux, et les tumeurs sont souvent dépendantes de son expression pour leur survie. Connaître les mécanismes conduisant à son expression représente donc un enjeu majeur pour prédire la dépendance d'une tumeur à cette protéine. De plus, cela permettrait de trouver des points de signalisations sensibles sur lesquels appuyer pour cibler cette dépendance, et déclencher l'apoptose des cellules tumorales. Le récepteur à dépendance UNC5B, qui a été l'objet principal de mon étude au cours de ma thèse, pourrait être l'un de ces moyens de régulation.

Les BH3 mimétiques, une classe de molécules prometteuse

La dérégulation des protéines de la famille Bcl-2 est un phénomène courant pendant la tumorigenèse. On observe la **surexpression de Bcl-2** dans de nombreuses pathologies, comprenant le cancer du sein et de la prostate, le glioblastome ou encore les lymphomes (Placzek et al., 2010). De la même manière, on retrouve aussi une **surexpression de Mcl-1** dans les cancers de la prostate, les cancers du pancréas, les cancers oraux, dans les leucémies et dans les carcinomes hépatocellulaire (Dash et al., 2011; Maji et al., 2015; Placzek et al., 2010; Sieghart et al., 2006). Plus important, cette surexpression permet dans certains cas aux tumeurs **d'acquérir des résistances** face aux thérapies anticancéreuses (Maji et al., 2018).

Ces observations ont donné lieu à la mise au point d'une nouvelle classe de molécules thérapeutiques, les **BH3 mimétiques**, visant à cibler les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2, et ainsi à provoquer l'apoptose des cellules tumorales. Ces 15 dernières années ont vu fleurir une large palette de BH3 mimétiques, ciblant principalement Bcl-2, Bcl-XL et Mcl-1 (**Tableau 1**) (Cerella et al., 2020). Bien que les premiers BH3 mimétiques développés, l'ABT-263 et l'ABT-737, ciblent à la fois Bcl-2, Bcl-XL et Bcl-W, les générations suivantes ont été améliorées pour cibler spécifiquement une seule protéine de la famille Bcl-2 à la fois. Ainsi, des composés ciblant Bcl-2 et Bcl-XL ont rapidement été développés, puis plus tardivement des composés ciblant Mcl-1, du fait de paramètres chimiques plus contraignants (Merino et al., 2018).

Toutefois, parmi ces composés, seul le **Venetoclax** est parvenu à obtenir une autorisation de mise sur le marché pour le moment. En effet, l'utilisation pour des applications cliniques de ces composés est freinée par une **toxicité possible** sur les cellules saines. Par exemple, la protéine Mcl-1 joue un rôle crucial dans le maintien de nombreux types cellulaires tel que les cardiomyocytes (Thomas et al., 2013), les hépatocytes (Vick et al., 2009) ou encore les lymphocytes B et T matures et immatures (Opferman et al., 2003). Malgré tout, les essais en cours concernant ces inhibiteurs montrent des résultats encourageants, avec une toxicité limitée si une bonne fenêtre thérapeutique est respectée.

Tableau 1 : Liste des principaux BH3 mimétiques actuellement développés
Ki : constante d'inhibition ; *Kd* : constante de dissociation
 Adapté de (Cerella et al., 2020)

Nom de la molécule	Cible(s)	Statut clinique	Référence
BH3 mimétiques ciblant Bcl-2			
Venetoclax (ABT-199, GDC-0199)	Bcl-2 Ki<0.01 nM	Approuvé depuis 2017 pour le traitement des leucémies myéloïdes aiguës (LMA). En cours d'évaluation pour d'autres pathologies	(Souers et al., 2013a)
Navitoclax (ABT-263)	Bcl-2, Bcl-XL, et Bcl-W Ki ≤0.5–3.3 nM	Essais cliniques en cours pour le traitement de tumeurs solides et hématologiques (autre que LMA) (NCT03592576) (NCT03181126)	(Kivioja et al., 2019)
ABT-737	Bcl-2, Bcl-XL, et Bcl-W Ki<0.1 nM	Expérimental	(Pan et al., 2015)
BH3 mimétiques ciblant Mcl-1			
A-1210477	Mcl-1 Ki 0.45 nM	Outil de recherche, exclu pour l'utilisation clinique	(Leverson et al., 2015a)
AZD5991	Mcl-1 Ki 0.13 nM	Essai clinique en cours (NCT03218683)	(Tron et al., 2018)
AMG-176	Mcl-1 Ki 0.13 nM	Essai clinique en cours (NCT03797261)	(Caenepeel et al., 2018)
AM-8621	Mcl-1 Ki 0.06 nM	Expérimental	(Caenepeel et al., 2018)
S63845	Mcl-1 Ki<1.2 nM	Expérimental	(Kotschy et al., 2016a)
S64315 (MIK665)	Mcl-1 Ki 0.048 nM	Essai clinique en cours dans plusieurs cancers hématopoïétiques (NCT03672695) (NCT02979366) (NCT02992483)	(Szlavik et al., 2020)
VU661013	Mcl-1 Ki 97 pM	Expérimental	(Ramsey et al., 2018)
BH3 mimétiques ciblant Bcl-XL			
WEHI-539	Bcl-XL Kd 0.6 nM	Expérimental	(Tanaka et al., 2013)
A-1155463	Bcl-XL Ki<0.01 nM	Expérimental	(Wang et al., 2019)
A-1331852	Bcl-XL Ki<0.01 nM	Expérimental	(Anstee et al., 2019)

Chapitre 2 : UNC5B comme récepteur à dépendance

Classiquement, notre vision des récepteurs membranaires est très simple. Lorsque le ligand du récepteur est présent, il se fixe à celui-ci et induit un changement conformationnel, aboutissant à une signalisation spécifique. Lorsqu'il est absent, le récepteur est **inactif** et aucune signalisation n'en résulte. Dans certains cas de figure, la signalisation induite par le récepteur peut être nécessaire à la survie de la cellule. Ainsi, dans le cas d'une déprivation en ligand, celle-ci peut être éliminée **indirectement** par MCR. Cependant, en 1998, Patrick Mehlen et Dale Bredesen ont apporté une nuance supplémentaire à ce schéma classique, en élaborant le concept des **Récepteurs à Dépendance** (RD). Ces récepteurs, en plus de leur capacité à induire un signal intracellulaire en présence du ligand, sont aussi **actifs** en absence du ligand, en induisant un signal d'**apoptose** (Mehlen et al., 1998; Rabizadeh et al., 1993)(**Figure 9A**). Ces protéines ont été surnommées "récepteurs à dépendance" puisque l'expression de ce récepteur rend les cellules dépendantes de la disponibilité du ligand pour la survie. La double délétion du couple ligand/récepteur ne suffisant pas à déclencher l'apoptose, les cellules ne sont pas uniquement dépendantes de la signalisation positive du RD pour survivre.

1. Les récepteurs à dépendance, une famille fonctionnelle

A ce jour, plus d'une vingtaine de RD ont été décrit, parmi lesquels on peut citer (Negulescu and Mehlen, 2018) (**Figure 9B**) :

- Les récepteurs de la netrin-1, DCC (Deleted in Colorectal Carcinoma), UNC5Hs (UNCoordinated 5 Homologs 1/2/3/4 ou UNC5A/B/C/D) et Neogénine
- Les récepteurs au morphogène SHH (Sonic HedgeHog), Ptch1 (Patched) et CDON (cell-adhesion moleculerelated/ downregulated by oncogenes)
- Le récepteur aux neurotrophines p75^{NTR} (p75 NeuroTrophin Receptor)

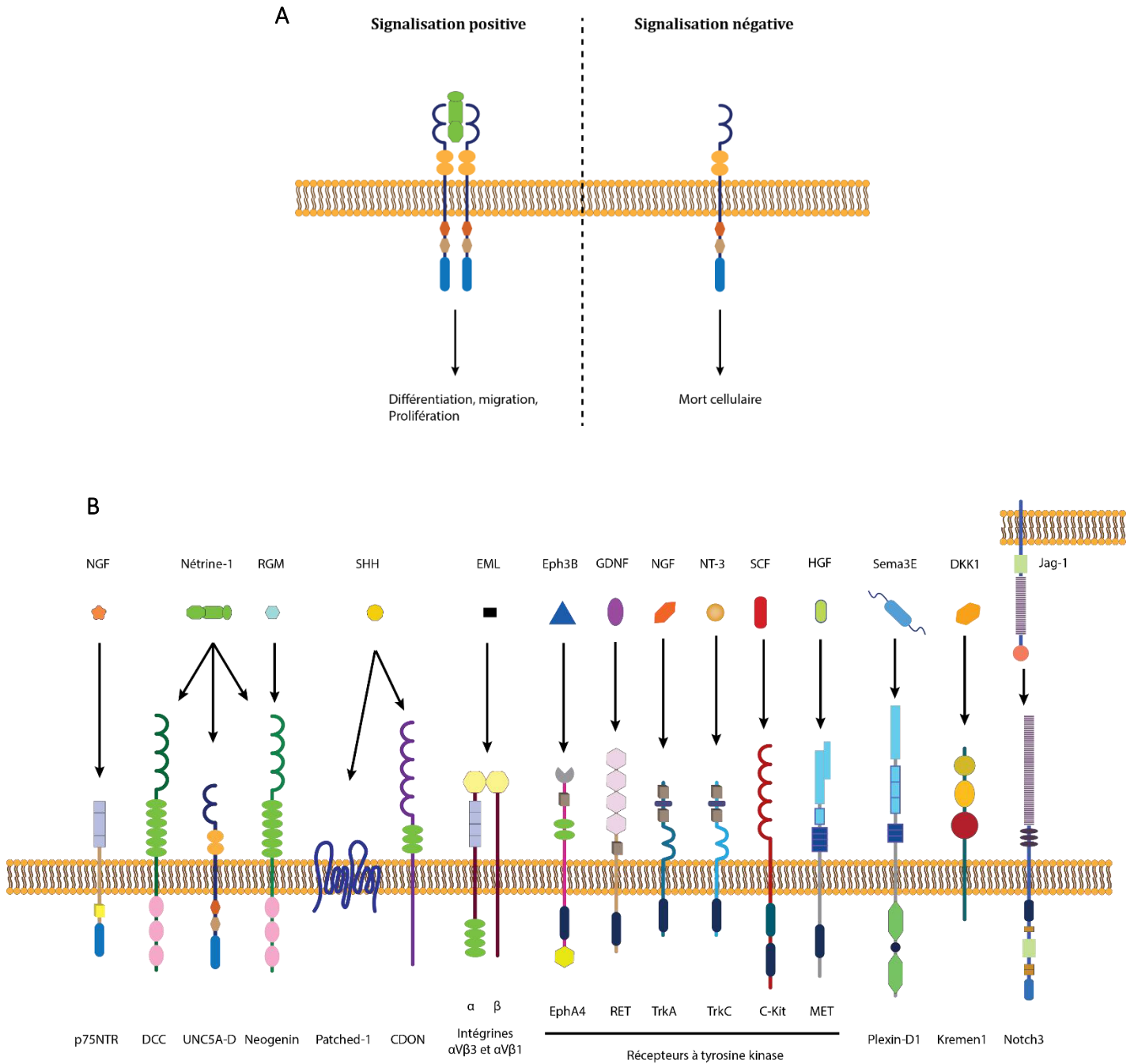


Figure 9 : Les récepteurs à dépendance, une famille fonctionnelle

(A) Signalisation bivalente des récepteurs à dépendance

(B) Membres actuellement connus de la famille des récepteurs à dépendance

- Les récepteurs à activité Tyrosine kinase, RET (REarranged during Transfection), TrkA et TrkC (Tropomyosin Receptor Kinase A and C), Eph4A (ephrin type A receptor 4), MET et enfin C-Kit, décrit très récemment (Wang et al., 2018)
- Le récepteur à la Semaphorin3E, Plexin-D1
- Certaines Intégrines
- Kremen-1
- Notch3

Ces récepteurs sont différents structurellement, et la définition de la famille des récepteurs à dépendance est avant tout basée sur leur homologie **fonctionnelle**. Elle se définit par la capacité d'induire une signalisation dite « positive » en présence du ligand, et d'induire une signalisation dite « négative » en l'absence de ligand, en induisant activement la mort cellulaire.

a) Rôle des récepteurs à dépendance dans le développement et l'homéostasie tissulaire

La grande majorité des récepteurs à dépendance ont été identifiés comme **régulateurs importants du développement embryonnaire**, en particulier dans le développement du **système nerveux**. Si une large partie de la littérature porte sur le rôle des voies de signalisations positives de ces récepteurs en présence du ligand pour ces processus, plusieurs études montrent que les voies de signalisations négatives contribuent aussi au développement. De manière générale, la fonction des voies pro-apoptotiques des récepteurs à dépendance dans le développement consiste à **éliminer les cellules migrant dans des régions dépourvues de ligand** (Mehlen and Guenebeaud, 2010).

Par exemple, les fonctions pro-apoptotiques du récepteur Patched sont importantes pour le développement du tube neural (Mille et al., 2009b; Thibert et al., 2003). Dans le cas de TrkC, la mort induite par l'absence de NT-3 (Neurotrophin-3) régule la survie des neurones sensoriels (Tauszig-Delamasure et al., 2007). Le récepteur de l'EphrinB3, Eph4A, contrôle le nombre de cellules neurales dans la zone sous-ventriculaire de la souris, une

région située dans le cerveau des vertébrés contenant les cellules neurales progénitrices (Furne et al., 2009). La nétrine, elle aussi, tient un rôle prépondérant dans le développement, que nous aborderons dans la partie dédiée à cette protéine (Voir Chapitre 2.2.a).

b) Les récepteurs à dépendance comme suppresseur de tumeur

En raison de la singularité de leur activité pro-apoptotique, la plupart des RD ont été présentés comme **suppresseur de tumeur**. En effet, l'expression des RD pourrait prévenir le développement des tumeurs en induisant l'apoptose des cellules tumorales se développant en excès par rapport à la quantité limitée de ligand disponible dans l'environnement extra-tumoral (**Figure 10A**). Par ailleurs, les RD pourraient empêcher la migration de cellules en dehors de la zone de disponibilité du ligand, limitant ainsi le développement de métastase. (Mehlen and Puisieux, 2006). En conséquence, le développement tumoral n'est possible que par l'inhibition constitutive des voies de mort induites par les récepteurs à dépendance. Cette inhibition est possible par trois mécanismes différents : (1) La **perte de l'expression du récepteur** ou sa mutation, (2) la **sécrétion autocrine du ligand** par les cellules tumorales, (3) la **modification de la voie pro-apoptotique** en aval du récepteur (**Figure 10B**). Ces trois mécanismes ont été décrits comme **avantages sélectifs** permettant à la tumeur d'échapper au mécanisme de suppresseur de tumeur des RD. Comme l'effet suppresseur de tumeur est induit seulement lors d'une croissance tumorale supérieure à la disponibilité en ligand, ou hors de son milieu d'origine, les RD sont considérés comme suppresseurs de tumeur conditionnels (Negulescu and Mehlen, 2018).

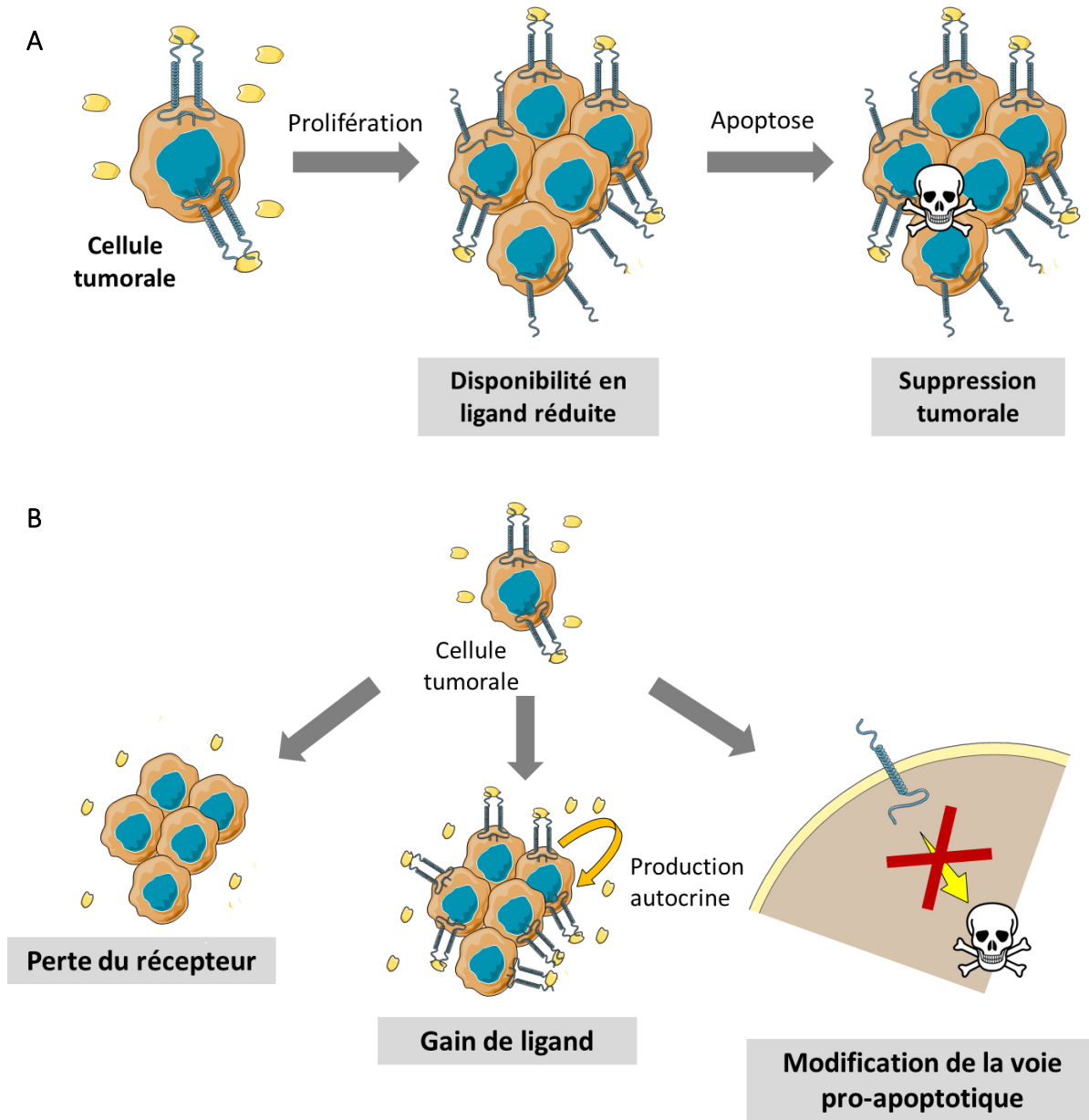


Figure 10 : Les récepteurs à dépendance comme suppresseur de tumeur.

(A) Mécanisme de suppression tumoral exercé par les récepteurs à dépendance.

(B) Avantages sélectifs permettant d'échapper au mécanisme de suppression tumoral des récepteurs à dépendance

i. Perte du récepteur dans les cancers

La perte du récepteur a été démontrée pour de nombreux membres de la famille des RD, en particulier pour les récepteurs à la nétrine. Ainsi, l'expression de DCC est perdue dans de nombreux cancers (Fearon et al., 1990; Kinzler and Vogelstein, 1996), ainsi que celle des gènes UNC5H, appuyant le fait que la perte des récepteurs confère un avantage sélectif pour le développement tumoral. (Bernet and Mehlen, 2007; Shin et al., 2007; Thiebault et al., 2003). Par exemple, les souris mutées pour UNC5H3 présentent une progression des tumeurs de l'intestin plus élevée (Bernet et al., 2007). Les souris transgéniques mutées pour inactiver l'activité pro-apoptotique de DCC développent des adénocarcinomes invasifs et présentent une augmentation des tumeurs de l'intestin lorsqu'elles sont croisées avec des souris mutées pour APC (Castets et al., 2011). De plus, les souris mutantes pour DCC montrent des anomalies de prolifération des cellules lymphoïdes, allant de l'hyperplasie lymphoïde au lymphome diffus à grandes cellules B (LDGC-B) (Broutier et al., 2016). Enfin, des mutations du récepteur UNC5H3 sont associées aux cancers colorectaux familiaux (Coissieux et al., 2011).

Au-delà des récepteurs à la nétrine, d'autres RD sont perdus durant la progression tumorale. Le récepteur Patched est muté ou perdu dans les carcinomes basocellulaires et dans les médulloblastomes (Wicking and McGlenn, 2001), alors que la perte de l'expression de c-Kit est décrite dans les neuroblastomes, le cancer thyroïdien et le cancer du sein (Natali et al., 1995; Natali et al., 1992a; Natali et al., 1992b). Eph4A est négativement régulé dans les cancers du sein, du foie et du rein, ainsi que dans les mélanomes (Easty et al., 1997; Fox and Kandpal, 2004; Hafner et al., 2004). De plus, Notch3 est aussi négativement régulé dans le cancer du sein, et sa perte est associée à de mauvais pronostics (Cui et al., 2013; Zhang et al., 2016). Une diminution de l'expression de TrkC est également décrite dans une large fraction de biopsies de cancer colorectaux humains, par le biais d'un mécanisme moléculaire impliquant la méthylation du promoteur. De plus, plusieurs mutations non-sens de TrkC, touchant l'activité pro-apoptotique de ce récepteur, ont été retrouvées dans plusieurs cancers sporadiques (Genevois et al., 2013).

ii. Gain de ligand dans les cancers

Alternativement à la perte ou la mutation du récepteur, les tumeurs pourraient bénéficier d'un autre avantage sélectif, le gain d'expression autocrine du ligand, leur permettant d'échapper à la voie de mort d'induite par les RD. En effet, la surexpression de nétrine-1 ciblée dans l'appareil digestif des souris augmente l'initiation et le développement tumoral dans l'intestin, grâce à l'inhibition de la mort cellulaire dans l'épithélium intestinal (Mazelin et al., 2004). Ces résultats expérimentaux sont étayés par des observations montrant un gain d'expression du ligand dans plusieurs cancers humains. On observe ainsi un gain de nétrine-1 dans les cancers colorectaux associés aux inflammations (Paradisi et al., 2008; Paradisi et al., 2009), dans les cancers du sein métastatiques (Fitamant et al., 2008), les cancers du poumon (Delloye-Bourgeois et al., 2009a), les neuroblastomes (Delloye-Bourgeois et al., 2009b) et les mélanomes (Boussouar et al., 2020), et ce gain de nétrine-1 est directement associé à la progression tumorale (Delloye-Bourgeois et al., 2009a; Delloye-Bourgeois et al., 2009b; Dumartin et al., 2010; Fitamant et al., 2008; Mazelin et al., 2004). En plus de la nétrine-1, d'autres ligands des RD sont associés à la tumorigenèse. Par exemple, le ligand de Plexin D1, la Semaphorin 3E est surexprimé dans les cancers du sein métastatiques (Luchino et al., 2013), Sonic Hedgehog dans le côlon, le poumon et dans les cancers du rein (Delloye-Bourgeois et al., 2013), la Neurotrophin-3, ligand de TrkC, dans le neuroblastome (Bouzas-Rodriguez et al., 2010), et le ligand de Kremen-1, DKK1, dans plusieurs cancers humains (Sato et al., 2010).

iii. Modification des voies de signalisations pro-apoptotiques

Actuellement, les voies de signalisation en aval des récepteurs sont encore peu connues, mais l'hypothèse d'une modification de ces voies est très probable dans le cadre de l'échappement tumoral.

C'est dans l'objectif de mieux comprendre ces rouages que ce projet de thèse est né. En effet, si les mécanismes de gain en ligand et de perte de récepteur ont déjà été décrit en profondeur, nous ne disposons encore que peu d'informations sur les voies de signalisation pro-apoptotiques induites par les RD.

c) Des mécanismes communs

La signalisation du récepteur en présence de ligand est très variée. Par exemple, les récepteurs DCC et UNCHs sont connus pour leur rôle dans le **guidage axonal**, avec l'induction de la voie de signalisation PI3K (phosphoinositide 3-kinase) /MAPK (mitogen-activated protein kinase) (Boyer and Gupton, 2018; Fazeli et al., 1997), alors que le couple Sema3E/PlexinD1 est décrit pour induire l'activation de RAS au cours de la formation de l'hippocampe pendant le stade embryonnaire (Mata et al., 2018). Cependant, on remarque que l'implication dans le développement de l'organisme est un trait commun à la voie de signalisation « positive » de tous ces récepteurs.

Concernant l'induction de la mort en absence du ligand, on retrouve plusieurs points communs partagés par la famille des RD. Ainsi, tous les récepteurs décrits à ce jour ont la particularité d'induire la mort cellulaire par **apoptose** (à voir pour Kremen1).

L'induction de cette signalisation pro-apoptotique semble n'être possible qu'après **monomérisation** des RD. En effet, la plupart des RD, mis à part Patched et les intégrines, se trouvent à l'état multimérique en présence de leur ligand (Goldschneider and Mehlen, 2010). Si l'organisation du récepteur en complexe multimérique est importante à la signalisation positive du RD, elle semble aussi nécessaire au blocage de la voie pro-apoptotique. Ainsi, p75^{NTR} ne peut induire l'apoptose que sous forme monomérique, et sa multimérisation forcée entraîne le blocage de cette apoptose, de la même manière que lorsque NGF (Nerve Growth Factor), le ligand, est présent (Rabizadeh et al., 1993). De même Mille *et al.* (Mille et al., 2009a) ont démontré que le blocage de la multimérisation induite par la nétrine-1 est suffisant pour déclencher la voie pro-apoptotique médiée par UNC5B et DCC.

Ensuite, la localisation des RD à la membrane plasmique se ferait préférentiellement au niveau des **radeaux lipidiques** de la membrane. Microdomaines de la membrane plasmique présentant un enrichissement en cholestérols, phospholipides et sphingolipides, ces radeaux sont des zones de la membrane privilégiées pour l'activité de protéines impliquées dans des processus cellulaires divers tels que l'endocytose ou l'apoptose (récepteurs de la voie extrinsèque). La localisation des RD au niveau de ces radeaux dépend de la palmitoylation des RD, indépendante de la présence du ligand. De plus, cette localisation

semble être un prérequis pour l'activité pro-apoptotique du RD, comme cela a été démontré pour DCC (Furne et al., 2006) ou UNC5B (Maisse et al., 2008). Cela permettrait de regrouper mécaniquement les protéines amenées à interagir ensemble pour faciliter la transduction du signal.

La transduction de ce signal pro-apoptotique passe, pour la majorité des RD, par un **clivage protéolytique du domaine intracellulaire dirigé par les caspases**. En absence du ligand, la conformation monomérique du récepteur permet l'exposition du/des sites de clivage, rendant ainsi possible l'action des caspases. La mutation du site de clivage supprime complètement la fonction pro-apoptotique du RD, ce qui montre que ce clivage est primordial pour l'induction de ce signal. La présence et l'implication d'un ou plusieurs sites de clivage ont clairement été démontrés pour la plupart des récepteurs, à l'exception de p75^{NTR} et des intégrines (Goldschneider and Mehlen, 2010). La mutation de ces sites de clivages, ainsi que l'ajout d'inhibiteurs de caspase inhibent logiquement le clivage de ces sites, mais aussi la mort induite par le RD. La nécessité d'un clivage par les caspases laisse toutefois entrevoir deux hypothèses : (1) le niveau d'activité basal des caspases dans la cellule est suffisant pour activer la voie pro-apoptotique des RD (2) la voie pro-apoptotique des RD nécessite une activation pro-apoptotique des caspases préalable, et les RD agissent comme amplificateur de ce signal pro-apoptotique.

Enfin, les RD ont comme point commun d'induire **l'activation de caspases initiatrices et effectrices**. Ainsi, l'activation des caspase 9 et 3 a été démontrée pour DCC, RET, TrkC et Patched, celle de la caspase 2 pour p75^{NTR} et celle des caspase 8 et 3 pour les intégrines (Goldschneider and Mehlen, 2010).

Malgré ces caractéristiques communes à la famille des RD, l'activation de ces caspases se fait par le biais de voies de signalisation différentes, pour les récepteurs dont la signalisation a été étudiée. Dans la partie suivante, nous décrirons quelques exemples montrant la diversité de ces signalisations.

i. TrkC, celui qui utilise la voie intrinsèque de l'apoptose.

La signalisation induite par TrkC démontre bien l'importance du clivage par les caspases pour le déclenchement de la mort cellulaire. En effet, ce récepteur est clivé sur deux sites sur la partie cytoplasmique du récepteur lorsque le ligand est absent, conduisant à la libération d'un fragment de 145 acides aminés. Ce fragment, dont la libération est nécessaire et suffisante à la mort cellulaire, est appelée « **killer fragment** »(Tauszig-Delamasure et al., 2007). Ce fragment interagit ensuite avec cobra1, un cofacteur de BRCA1. Le complexe cobra1/killer fragment migre alors à la membrane des mitochondries, où il induit la **perméabilisation mitochondriale** et la voie intrinsèque de l'apoptose, avec le recrutement de BAX à la membrane, le relargage du cytochrome c et l'assemblage de l'apoptosome, puis, in fine, l'activation des caspases 9 puis 3 (Ichim et al., 2013)(**Figure 11**).

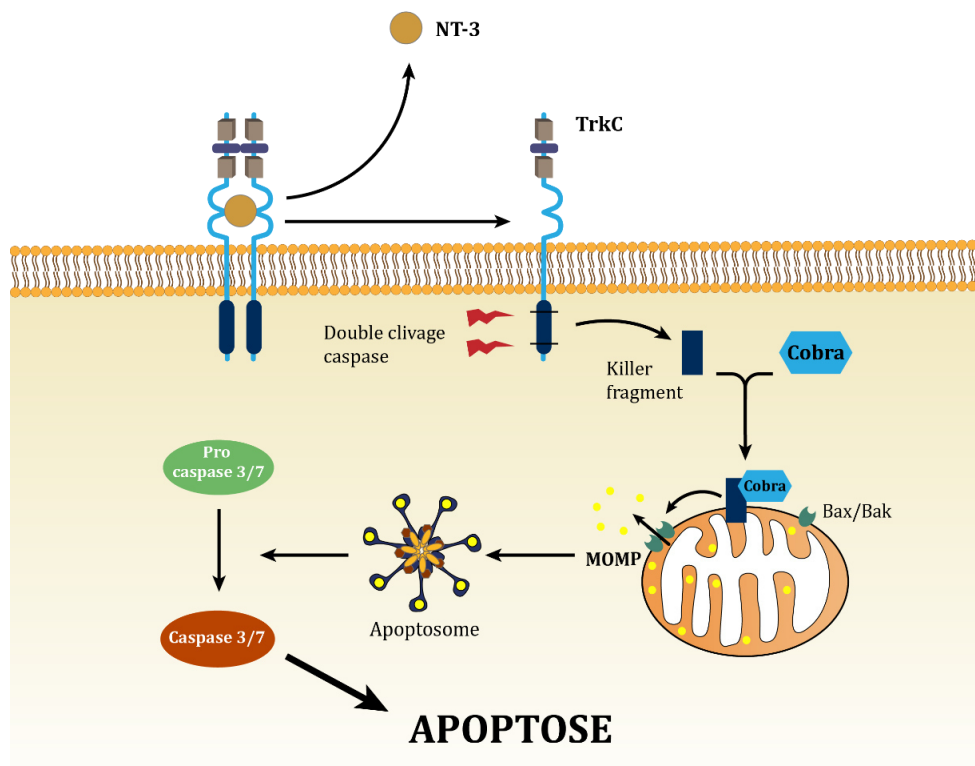


Figure 11 : Voie pro-apoptotique du récepteur à dépendance Trk-C

Une étude récente montre que le killer fragment de TrkC est aussi transloqué dans le noyau, stabilisant le facteur de transcription p53 via l'inhibition de la transcription de l'inhibiteur de p53, MDM2. p53 transcrit alors les effecteurs de l'apoptose cobra1 et BAX, ce

qui amplifie l'apoptose induite par TrkC (Menard et al., 2018). Cet exemple nous montre que si le début de la signalisation de ce RD est spécifique, l'activation des caspases passe tout de même par la voie intrinsèque « classique » de l'apoptose après la perméabilisation de la mitochondrie.

ii. Patched, celui qui active la caspase 9 différemment.

Dans le cas du RD Patched, l'activation des caspases se fait de manière moins classique. En l'absence du ligand SHH, le septième domaine intracellulaire de Patched est clivé par les caspases, permettant la formation d'un complexe comprenant le récepteur, la protéine adaptatrice DRAL, une protéine adaptatrice des caspases, TUCAN, et la caspase 9. Ce complexe recrute ensuite NEDD4, une E3 ubiquitine ligase, qui catalyse la poly-ubiquitination de la caspase 9. Cette ubiquitination ne dirige pas la caspase 9 vers le protéasome, mais provoque son agrégation et son auto-activation. La caspase 9 active ensuite la caspase 3 pour provoquer la mort de la cellule (Fombonne et al., 2012; Mille et al., 2009b)(**Figure 12**). Il est intéressant de noter que ce mode d'activation est déjà décrit pour la caspase 8 et les récepteurs TRAILs (Jin et al., 2009), mais jamais pour la caspase 9. Nous avons donc ici un exemple où le RD utilise une voie « non classique » pour induire la mort cellulaire.

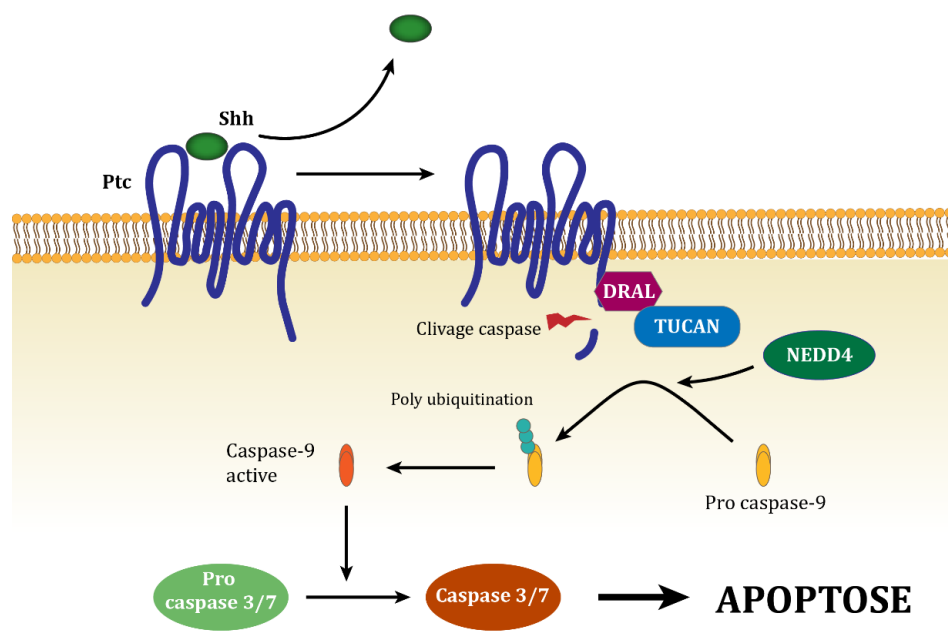


Figure 12 : Voie pro-apoptotique du récepteur à dépendance Patched

iii. Les récepteurs UNC5, plusieurs voies dans la même famille

Malgré une **forte homologie structurelle**, les récepteurs de la famille UNC5 ne partagent pas les mêmes voies pro-apoptotiques. UNC5A, par exemple, induit la mort grâce à son interaction avec NRAGE (Neurotrophin Receptor-interacting MAGE homolog), via son domaine ZU5. En présence de UNC5A, NRAGE serait séquestré à la membrane. En absence de son ligand, la nétrine-1, UNC5A est clivé, libérant le complexe intracellulaire UNC5A/NRAGE dans le cytoplasme (Williams et al., 2006b). NRAGE pourrait ensuite provoquer l'apoptose en interagissant et en dégradant la protéine de survie XIAP (Jordan et al., 2001), ou en activant JNK (c-Jun N-terminal kinase) et la voie de signalisation des caspases (Salehi et al., 2002).

Dans le cas de UNC5D, l'absence de netrine-1 mène aussi au clivage du récepteur par les caspases, ce qui génère un fragment intracellulaire (UnICD), qui transloque vers le noyau. Ce fragment interagit ensuite avec le facteur de transcription E2F1, qui active alors spécifiquement des gènes pro-apoptotiques. (Zhu et al., 2013)

Le récepteurs UNC5B possède lui aussi une signalisation propre, qui sera décrite plus en détail dans la partie suivante, dédiée à ce récepteur.

2. UNC5B

Le récepteur UNC5B, au même titre que le récepteur DCC, est **l'un des premiers récepteurs à dépendance** à avoir été mis en évidence et caractérisé. Pour cette raison, il fait partie des récepteurs à dépendance prototypiques, ayant posé les bases des mécanismes et des fonctions des récepteurs à dépendance. Ce récepteur partage avec DCC le même ligand, la nétrine-1, une protéine dont les fonctions sont très largement décrites dans la littérature, dont nous ferons ici un bref résumé.

a) Netrine-1

La première caractérisation d'un membre de la famille des nétrines remonte à 1992 lorsque UNC-6 (Uncoordinated-6) fut identifié chez *Caenorhabditis elegans* pour son implication dans le **guidage des axones et la migration neuronale** (Ishii et al., 1992). Par la suite de nombreuses nétrines furent identifiées, dans de multiples espèces vertébrées et

invertébrées (Lai Wing Sun et al., 2011), permettant d'identifier un rôle conservé pour le guidage de la migration cellulaire et de la croissance axonale dans le système nerveux embryonnaire. Confirmant une hypothèse formulée dès la fin du XIX^{ème} siècle par Santiago Ramon y Cajal, affirmant l'existence de facteurs diffusibles permettant le guidage axonal au cours du développement, deux homologues de cette famille protéique furent pour la première fois purifiés par M. Tessier Lavigne et son équipe, en 1994. Ils isolèrent la nétrine-1 et la nétrine-2 à partir d'embryons de poulet, et décidèrent de la nommer Nétrine, issue du terme Sanskrit « netr », signifiant « celui qui guide », en référence à son statut de **facteur chimiotrope** (Serafini et al., 1994).

Les nétrines sont très conservées au cours de l'évolution, même s'il existe des formes spécifiques en fonction des espèces. Chez les mammifères, il existe **trois nétrines sécrétées**, la nétrine-1, 3 et 4, et **deux autres formes de nétrines associées à la membrane**, liées par une ancre GPI (glycophosphatidylinositol), la nétrine G1 et G2.

La famille des nétrines appartient à la superfamille des protéines de type **laminine**, dont les membres sont composés d'environ 600 acides aminés formant au niveau protéique trois domaines majeurs (**Figure 13**). L'extrémité N-terminale est composée d'un **domaine VI** et d'un **domaine V**, lui-même composé de trois motifs EGF (Epidermal Growth Factor). Ces domaines sont homologues aux chaînes gamma des laminines pour les nétrines 1 et 3, et aux chaînes beta des laminines pour les nétrines 4, G1 et G2 (Serafini et al., 1994). Dans le cas des nétrines sécrétées, ces domaines sont associés à une extrémité en C-terminal, appelée « Domaine C » ou **Netrin-like domain (NTR)**. Ce domaine ne possède pas d'homologie avec les laminines mais permettrait d'apporter, en plus des domaines VI et V, différentes interactions avec la matrice extracellulaire (Lai Wing Sun et al., 2011). Concernant la nétrine-1, les domaines laminine situés en N-ter sont nécessaires à l'interaction avec ses récepteurs transmembranaires canoniques UNC5B et DCC. Ces caractéristiques font de la nétrine-1 une molécule sécrétée capable d'interagir avec la matrice extracellulaire et les cellules environnantes pour assurer des fonctions très variées.

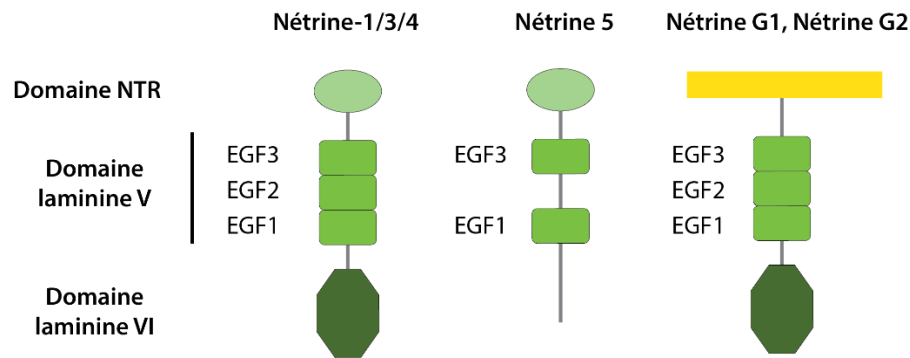


Figure 13 : Structure des Nétrines

La nétrine-1 a d'abord été très largement décrite pour son rôle dans le développement du système nerveux, en tant que **facteur de guidage axonal**. Ainsi, la nétrine-1 contrôle **l'attraction, la répulsion ou l'élongation** des axones vers des sites spécifiques, mais aussi la **synaptogenèse**, assurant le bon développement du réseau neuronal (Boyer and Gupton, 2018). Pendant le développement et le maintien des tissus, la nétrine-1 joue aussi un rôle en dehors du système nerveux, en régulant **l'adhésion cellulaire** et la **morphogenèse des organes branchés** comme la glande mammaire (Srinivasan et al., 2003) ou le poumon (Liu et al., 2004). Cette protéine est aussi décrite dans **l'angiogenèse** (Castets and Mehlen, 2010), dans la **régulation immunitaire** (Mirakaj and Rosenberger, 2017), et comme régulateur de la **pluripotence cellulaire** (Huyghe et al., 2020; Ozmadenci et al., 2015). Enfin, comme nous l'avons vu précédemment, la nétrine-1 est aussi impliquée dans le contexte tumoral, où elle **promeut la prolifération, la migration et la survie des cellules tumorales** (Bernet and Fitamant, 2008; Chen et al., 2017).

L'ensemble de ces fonctions est très varié, avec parfois même des effets opposés, et une seule molécule ne permettrait pas d'obtenir des effets aussi finement régulés. La nétrine-1 fonctionne donc en tandem avec **un répertoire de récepteurs** assurant la diversité et la spécificité des signaux qu'elle transmet. Bien que UNC5B et DCC soient les récepteurs prototypiques associés à ce ligand, la nétrine-1 est décrite pour interagir avec d'autres récepteurs et corécepteurs. Ces récepteurs sont tous des récepteurs à un seul domaine transmembranaire, parmi lesquels on compte les homologues de UNC5B, UNC5A, C et D, le récepteur DSCAM (Down-syndrome cell adhesion molecule) (Rajasekharan and Kennedy, 2009), le précurseur amyloïde (APP) (Rama et al., 2012), certaines intégrines (Yebra et al.,

2003), le récepteur adénosine A2b (Corset et al., 2000), et la néogénine (Keino-Masu et al., 1996).

La nétrine-1 est donc une **protéine pléiotrope**, dont les mécanismes d'action sont complexes, impliquant plusieurs récepteurs, aux **voies de signalisation bivalentes**, suscitant un vif intérêt dans la communauté scientifique. Paradoxalement, les voies de signalisation induites par UNC5B, avec et sans nétrine-1, sont encore peu connues...

b) La famille UNC5

A l'instar de la famille Nétrine, le récepteur UNC5 fut identifié chez *Caenorhabditis elegans* comme un récepteur transmembranaire de guidage axonal (Leung-Hagesteijn et al., 1992), prédit pour interagir avec l'orthologue de la nétrine-1, UNC6. Par la suite, **quatre homologues** furent décrits chez les mammifères, appelés UNC5H1, 2, 3 et 4 (respectivement UNC5A, B, C, D chez l'homme) (Leonardo et al., 1997). En plus de la Nétrine-1, les récepteurs UNC5 sont aussi décrit pour interagir avec la Nétrine-3 (Wang et al., 1999), Robo4 (Koch et al., 2011), la Draxine (Ahmed et al., 2011) et FLRT2 et 3 (Yamagishi et al., 2011).

i. Structure

D'un point de vue structurel, les récepteurs UNC5 sont très proches, avec une taille d'environ 110kDa, et un domaine extracellulaire comprenant **deux domaines thrombospondines de type I**, et **deux domaines de type immunoglobuline**. La partie intracytoplasmique, elle, se décompose en trois domaines conservés : le **domaine Zu-5** (Zona-occludens/Unc-5 homology domain), le **domaine UPA** (Unc-Pidd-Ankyrins) contenant une séquence d'interaction avec le domaine P3 de DCC appelée DB (DCCBinding), et pour finir un **domaine de mort DD** (death domain), que l'on retrouve aussi dans les récepteurs de mort de la famille TNF. L'interaction avec la nétrine se produit entre les domaines laminine de la nétrine et les domaines immunoglobulines de l'extrémité N-Ter des récepteurs UNC5 (Grandin et al., 2016).

Plus spécifiquement, concernant UNC5B, le gène codant chez l'homme est situé sur le chromosome 10q22.1, et code pour une protéine de 945 acides aminés, avec 2 isoformes possibles formés par épissage alternatif. UNC5B est aussi caractérisé par un site de clivage

caspase situé dans sa partie cytoplasmique (D412), qui serait impliqué dans son activité pro-apoptotique (Llambi et al., 2001).

ii. Expression et régulation

Conformément à son rôle prédominant pendant le développement, UNC5B est exprimé au niveau de la moelle épinière dans les ganglions sensoriels dorsaux, au niveau de la rétine dorsale et dans le cervelet pendant le développement (Leonardo et al., 1997). Il est aussi exprimé en dehors du système nerveux, où on le retrouve dans des organes en développement tel que le poumon, l'œil, ou le système vasculaire (Engelkamp, 2002).

Après le développement, l'expression de UNC5B devient plus faible, mais reste plutôt ubiquitaire dans l'organisme (Thiebault et al., 2003). Toutefois, peu de données récentes sont disponibles concernant l'expression de UNC5B dans les tissus adultes. Selon la base de données « The Human Protein Atlas », UNC5B est exprimé dans un large panel de tissus adultes (**Figure 14**).

Du point de vue de la régulation transcriptionnelle, là aussi peu d'informations sont disponible, mais UNC5B semble être directement régulé par le suppresseur de tumeur p53. L'induction de p53 à la suite d'un traitement à la doxorubicine provoque une augmentation considérable des transcrits UNC5B (Paradisi et al., 2013; Tanikawa et al., 2003).

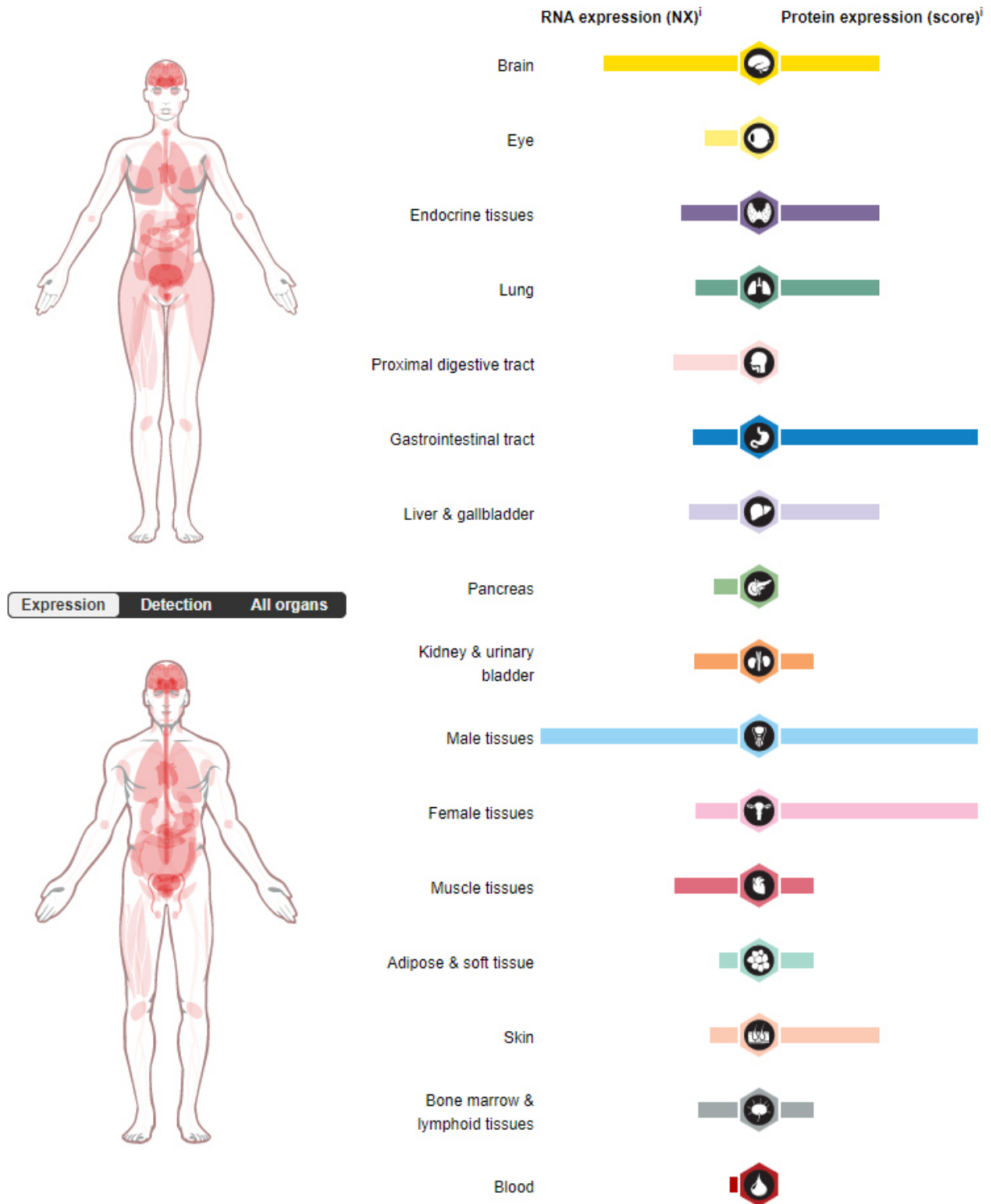


Figure 14 : Expression du récepteur à dépendance *UNC5B* dans les tissus humains adultes

Source : The Human Protein Atlas

(NX) : Expression Normalisée de donnée issues de trois sources différentes (HPA, GTEx and FANTOM5)

(Score) : Expression "haute", "moyenne" et "basse", basé sur les coupes immunohistochimiques de la base de donnée The Human Protein Atlas

iii. Fonction

UNC5B, par sa nature de récepteur à dépendance, possède des fonctionnalités bivalente, dépendante de la présence ou non de la nétrine-1.

Signalisation positive

Associé à son ligand, UNC5B présente un panel de fonctions très variées. Dans un premier temps, ce sont ses fonctions de **facteur de guidage axonal répulsif** dans le développement du système nerveux qui ont été identifiées. En formant un hétérodimère avec DCC, UNC5B permet une répulsion axonale de longue portée (Boyer and Gupton, 2018). De plus, nétrine-1 favorise la survie neuronale à travers l'interaction de UNC5B avec PIKE-L (PI 3-Kinase Enhancer)(Tang et al., 2008).

Lors du développement du système vasculaire, UNC5B est exprimé dans les cellules endothéliales artérielles et les capillaires en bourgeonnement. Dans ce contexte, le rôle du couple UNC5B/nétrine-1 est controversé. En effet, l'inactivation du récepteur chez la souris mène à une augmentation de l'angiogenèse (Lu et al., 2004), alors que l'inactivation de la nétrine-1 provoque la provoque une perte des vaisseaux dans le développement du poisson zèbre (Wilson et al., 2006). Ces données pourraient être réconciliées par le modèle des récepteurs à dépendance. Ensemble, UNC5B et la nétrine-1 aurait un effet pro-angiogénique, et en absence de son ligand, UNC5B aurait un rôle d'inhibiteur de l'angiogenèse par le biais de son activité pro-apoptotique. Le couple ligand récepteur participerait donc **à régulation et à l'organisation du développement des vaisseaux sanguins** (Castets et al., 2009).

Le couple UNC5B/NTN1 a aussi été décrit pour son rôle dans la **modulation de l'inflammation**, et peut être pro- ou anti-inflammatoire selon le contexte. Ainsi la nétrine-1 et son récepteur auront une tendance anti-inflammatoire pendant la réponse inflammatoire aigue (Tadagavadi et al., 2010; Xie et al., 2018). A l'inverse le couple aurait un effet pro-inflammatoire dans certains contextes, comme par exemple la rétention des macrophages dans le cas d'artériosclérose (van Gils et al., 2012).

Enfin, une étude récente de Huyghe et al (Huyghe et al., 2020) montre qu'une balance des récepteurs UNC5B et néogénine, activée par la nétrine-1, corégule les voies de

signalisation WNT et MAPK et **induit la pluripotence naïve** des cellules souches embryonnaires murines et humaines.

Il est intéressant de noter que la signalisation de UNC5B se produit par homodimérisation, mais peut se produire par l'hétérodimérisation de UNC5B avec d'autres récepteurs de la nétrine (Boyer and Gupton, 2018), permettant, par le biais de ses ligands, une palette variée de signalisations. La signalisation en présence du ligand induite en aval du récepteur, au-delà de quelques partenaires clés, reste très peu documentée, et aucune voie de signalisation canonique spécifique au récepteur UNC5B n'a été identifiée à ce jour.

Signalisation négative ou pro-apoptotique

Comme nous l'avons vu précédemment, les récepteurs à dépendance peuvent jouer un rôle dans le développement et l'homéostasie cellulaire par le biais de leur signalisation pro-apoptotique. En particulier, UNC5B pourrait en partie réguler la **migration neuronale** en induisant l'apoptose dans les neurones olivaires (Llambi et al., 2001).

UNC5B pourrait aussi jouer un rôle déterminant dans l'angiogenèse développementale. Ainsi, la nétrine-1 agirait comme facteur de survie pour les cellules endothéliales exprimant UNC5B, et aurait un rôle **pro-angiogénique** en bloquant l'apoptose induite par UNC5B. Le récepteur aurait donc un rôle régulateur sur la formation des vaisseaux sanguins (Castets et al., 2009).

D'un point de vue mécanistique, les éléments connus de la voie de signalisation pro-apoptotique de UNC5B concernent essentiellement les interactions directes avec le récepteur à la membrane. En présence de nétrine, UNC5B est stabilisé sous forme dimérisée et adopte une conformation fermée, où les domaines ZU5 et DD interagissent (Wang et al., 2009). Dans cette conformation, il interagit d'une part avec la DAPK (sérine/thréonine Death-Associated Protein Kinase) et s'associe d'autre part avec la phosphatase PP2A et son inhibiteur CIP2A. Lorsque la nétrine est absente, UNC5B se retrouve sous forme monomérique, et adopte une conformation ouverte, qui permet le clivage protéolytique de son domaine intracellulaire, et la perte de l'inhibition de CIP2A sur PP2A. La phosphatase peut ainsi catalyser la déphosphorylation de la DAPK, qui induit alors la mort par le biais de mécanismes encore inconnus (Guenebeaud et al., 2010; Llambi et al., 2005)(**Figure 15**).

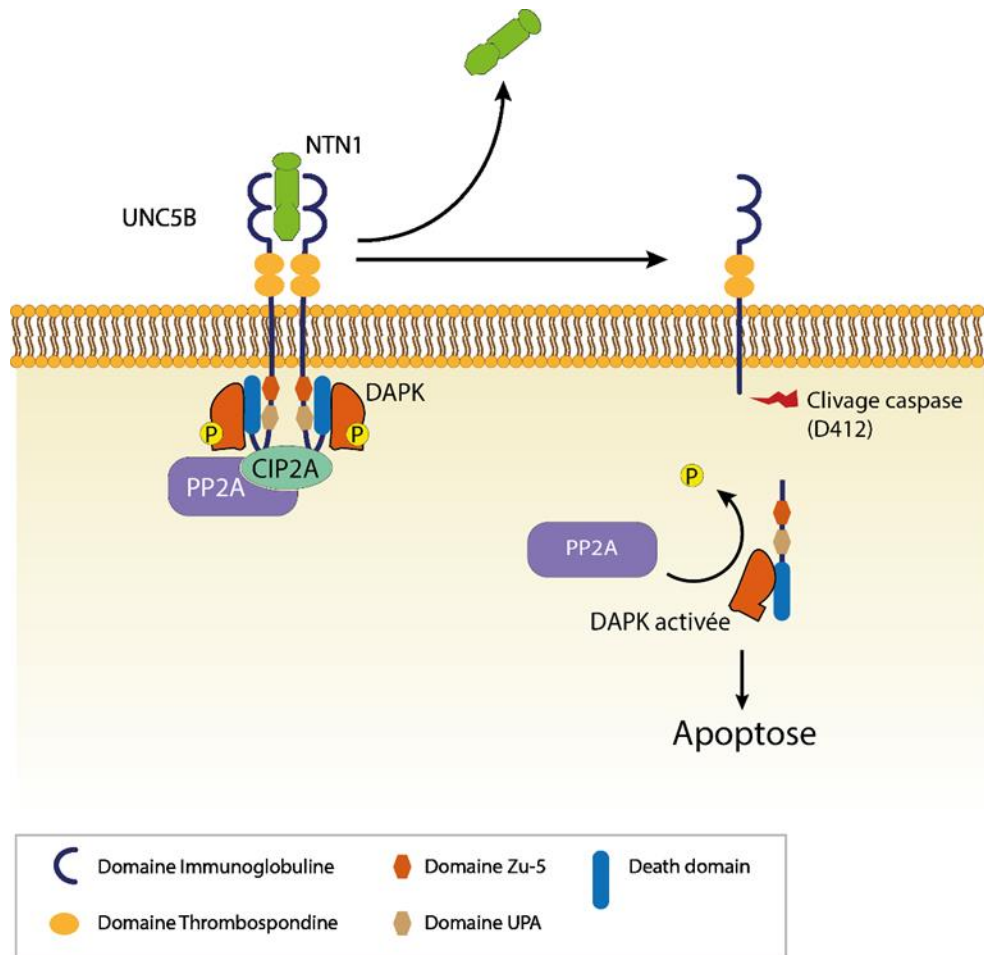


Figure 15 : Modèle d'induction de l'apoptose par le récepteur à dépendance UNC5B

iv. UNC5B dans les cancers

Plusieurs études montrent que UNC5B agirait comme **suppresseur de tumeur**, par le biais de sa signalisation pro-apoptotique. La famille des récepteurs UNC5 est **régulée négativement dans plusieurs cancers humains**, incluant les cancers du sein, de l'estomac, du poumon, de l'utérus, du rein et colorectaux (Thiebault et al., 2003). Liu et al ont observé une diminution de l'expression du récepteur dans le cancer de la vessie en comparant des tissus cancéreux de patients aux tissus adjacents sains. De plus, les tumeurs avec les plus faibles expressions de UNC5B sont associées aux plus grands risques de rechute et de moins bons pronostics (Liu et al., 2013). A l'inverse, la surexpression de UNC5B dans des cellules de cancer de la vessie inhibe la prolifération tumorale (Kong et al., 2016).

Dans de nombreux cas, la fonction de suppression tumorale médiée par UNC5B est contournée par les tumeurs par le biais d'une production autocrine du ligand, la nétrine-1, comme nous l'avons vu en chapitre 2.1.ii. L'avantage du gain de nétrine-1 est double, car la signalisation positive induite par le récepteur en présence du ligand peut favoriser la plasticité et la croissance tumorale. Par exemple, l'expression de nétrine par les CAF (cancer associated fibroblasts) issues du poumon ou du colon, en présence de cellules cancéreuses, conduit à l'augmentation du caractère souche des cellules tumorales (Sung et al., 2019).

L'interaction nétrine1-UNC5B représente donc une cible thérapeutique intéressante dans le but de traiter les cancers sur-exprimant la nétrine-1.

v. Approche thérapeutique

Dans ce but, le laboratoire a élaboré plusieurs modèles montrant que **l'inhibition de l'interaction entre la nétrine et ses récepteurs** était suffisante pour **induire une apoptose dépendante des récepteurs**, permettant la **régression tumorale** (Delloye-Bourgeois et al., 2009a; Delloye-Bourgeois et al., 2009b; Fitamant et al., 2008; Paradisi et al., 2009). Dans ces modèles, l'inhibition de la nétrine est réalisée en utilisant deux protéines recombinantes, correspondant aux domaines fibronectine 4 et 5 de DCC (DCC4-Fbn et DCC5-Fbn), qui sont capables de se lier à la nétrine, et d'empêcher son interaction avec les récepteurs (Mille et al., 2009a). Par ailleurs, l'interférence entre la nétrine et ses récepteurs peut s'avérer efficace en combinaison avec des chimiothérapies conventionnelles. Dans une étude de 2013, Paradisi et al montrent que des traitements tels que la cisplatine et la doxorubicine sur différentes lignées cancéreuses provoquent une augmentation de l'expression de la nétrine-1 et de ses récepteurs, dépendante de p53. Cette augmentation s'avère être un mécanisme de survie, que l'interférence avec la nétrine-1 permet de contourner, déclenchant la mort cellulaire *in-vitro* et ralentissant la croissance tumorale *in-vivo* (Paradisi et al., 2013).

Cependant, bien qu'efficaces et prometteuses, les molécules interférant avec la nétrine-1 ne représentaient pas une approche thérapeutique efficace, à cause de leurs mauvaises caractéristiques pharmacocinétiques. Pour résoudre ce problème, le laboratoire a développé en collaboration avec la start-up Netris Pharma plusieurs **anticorps**

monoclonaux neutralisant la nétrine-1. L'un de ces anticorps, le **NP137**, est actuellement en phase clinique II au centre Léon Bérard à Lyon (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02977195>) (Grandin et al., 2016). L'anticorps anti-nétrine1 est utilisé sur des tumeurs surexprimant la nétrine-1, et présente donc l'avantage d'être spécifique des cellules tumorales, permettant ainsi un traitement très ciblé.

Enjeux et objectifs du projet de recherche

La famille des récepteurs à dépendance est une famille en expansion, s'étoffant au fil des découvertes, comme avec les découvertes récentes des activités de récepteurs à dépendance Kremen1 (Causeret et al., 2016) et c-kit (Wang et al., 2018). Si fonctionnellement, les récepteurs de cette famille ont été caractérisés en détail, la mécanistique derrière cette fonction reste peu étudiée. Malgré le fait que UNC5B est l'un des récepteurs à dépendance prototypique, beaucoup de zone d'ombres demeurent quant à sa signalisation, aussi bien en présence qu'en absence de son ligand, la Nétrine-1.

Les enjeux concernant l'exploration de la voie de signalisation pro-apoptotique de UNC5B sont multiples. Du point de vue d'une recherche très fondamentale d'une part, étudier les voies de signalisation du récepteur permettrait de mieux comprendre son rôle dans un contexte physiologique. D'autre part, dans un contexte pathologique, identifier les partenaires pro-apoptotiques de UNC5B est crucial pour comprendre certains mécanismes d'adaptation tumorale possibles. En effet, nous avons décrit précédemment que le gain en ligand (Delloye-Bourgeois et al., 2009a; Delloye-Bourgeois et al., 2009b; Paradisi et al., 2008) ou la perte d'expression du récepteur (Thiebault et al., 2003) sont des avantages sélectifs permettant à la tumeur de contourner la suppression tumorale induite par UNC5B. A ces avantages sélectifs pourrait s'ajouter la modification des voies de signalisations apoptotiques en aval du récepteur. Dans le contexte thérapeutique de l'anticorps NP137 anti-nétrine-1 développé par notre laboratoire, identifier les partenaires clés de UNC5B permettrait d'anticiper des résistances possibles au NP137, et donc de mieux cibler les tumeurs dans lesquelles ce traitement serait applicable. De plus, nous pourrions élaborer des stratégies thérapeutiques plus poussées, en étudiant de possibles combinaisons avec d'autres traitements anti-tumoraux.

Dans le cadre de ce projet de thèse, nous chercherons donc à identifier de nouveaux partenaires pour UNC5B, afin d'en déchiffrer la voie pro-apoptotique. Pour parvenir à cet objectif, nous proposons de réaliser un criblage CRISPR-Cas9 qui nous permettra d'obtenir

une liste de partenaires potentiels. En parallèle, nous nous attacherons à mieux définir la mort induite par UNC5B, en regardant les implications possibles des voies intrinsèques et extrinsèques de l'apoptose. Ces partenaires seront ensuite validés expérimentalement, d'abord *in vitro*, puis dans un contexte thérapeutique *in vivo*. L'objectif à terme est d'appliquer les connaissances que nous aurons acquies au cours de ce processus pour améliorer les stratégies thérapeutiques déjà existantes utilisant l'anticorps nétrine-1.

Approche technique

1. Criblage CrispR-Cas9

Lorsqu'il s'agit d'explorer de nouvelles voies de signalisation, dont les partenaires sont encore largement inconnus, les techniques de criblage à l'échelle génomique s'avèrent très puissantes. Dans le cadre de mon projet de thèse, il était nécessaire de s'orienter vers des techniques très exploratoires afin d'apporter un regard nouveau sur la signalisation de UNC5B. Nous avons donc fait le choix d'utiliser l'une de ces techniques de criblage à l'échelle génomique, le criblage CRISPR/Cas9.

La technique CRISPR/Cas9 est directement adaptée d'un mécanisme d'immunité acquise bactérienne se basant sur des séquences ADN CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) observées pour la première fois par Ishino et al (Ishino et al., 1987). Lors de l'acquisition de l'immunité, l'ADN exogène provenant de virus ou de plasmides est reconnu par un complexe Cas (CRISPR associated genes), qui coupe et incorpore la séquence exogène dans les séquences CRISPR. Ces séquences seront ensuite transcrites en ARN CRISPR (crARN), qui serviront lors de nouvelles infections à cibler les séquences exogènes, et à mener leur dégradation par les protéines Cas9 (Barrangou et al., 2007).

Ce système a ensuite été dérivé en outil biotechnologique par Jinek et al, qui ont reprogrammé l'une de ces protéines Cas provenant de *Streptococcus pyogenes*, la Cas9, afin de lui faire cibler la séquence d'ADN désirée par le biais d'un ARN guide appelé single guide RNA (sgARN) (Jinek et al., 2012). La Cas9 va ensuite catalyser la cassure double brin de l'ADN ciblé, qui sera réparé par défaut par le système de réparation non homologue de la cellule (jonction d'extrémités non homologues), occasionnant des erreurs de réparation. Ces erreurs vont alors générer des changements, insertions ou délétions de bases, ce qui occasionnera des mutations et des décalages du cadre de lecture, pouvant aboutir au knock-out du gène (**figure 16**). Cette découverte a ouvert la porte à de nombreuses applications en biologie moléculaire se basant sur le système CRISPR-Cas9, permettant l'inactivation de gène, l'édition, ou encore la modulation de l'expression génique. Parmi ces applications,

l'utilisation de bibliothèques de séquences de sgARN permet l'élaboration de technique de criblage de gènes. Dans ce cas de figure, on utilise la bibliothèque de sgRNAs pour générer une bibliothèque de cellules invalidées pour un gène qui serviront, grâce à un read-out adapté, à identifier des gènes clés impliqués dans les processus étudiés.

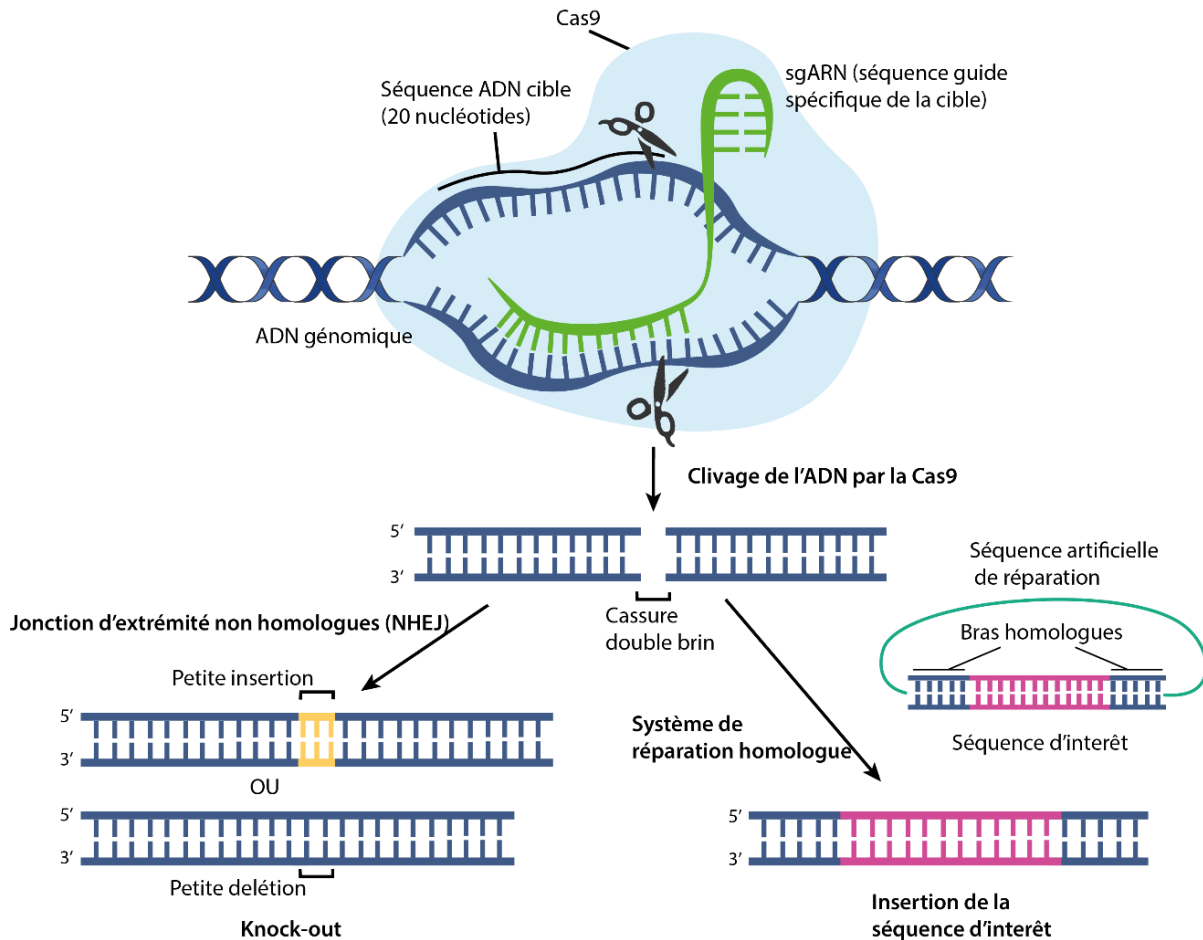


Figure 16 : Mécanisme du système CRISPR-Cas9

Dans notre cas, c'est-à-dire pour identifier les mécanismes conduisant à l'induction de l'apoptose induite par UNC5B, le read-out dont nous disposons est la survie ou non de la cellule. Le point de départ du projet a donc été d'utiliser une lignée conditionnelle surexprimant UNC5B, permettant de provoquer la mort cellulaire après induction à la doxycycline. Nous avons infecté ces cellules avec une bibliothèque CRISPR-Cas9 à l'échelle génomique provenant du laboratoire Zhang (Zhang lab's Human CRISPR knockout pooled

library - GeCKOv2 sgRNA library (Sanjana et al., 2014; Shalem et al., 2014). La librairie cible 19050 gènes, et est séparée en deux librairies (A et B), contenant chacune 3 sgARN dirigés contre chaque gène, pour un total de 6 sgARN par gène dans la librairie entière, et 1000 séquences contrôle. Les cellules ont été infectées avec une multiplicité d'infection permettant d'avoir statistiquement un gène invalidé par cellule, puis les cellules infectées ont été sélectionnées par le biais de leur résistance à la puromycine. Cette infection a été réalisée en collaboration avec l'équipe « Infection virale et pathologie comparée » de Lyon. Ainsi, après induction de UNC5B et de la mort cellulaire, les cellules survivantes sont les cellules invalidées pour un gène indispensable à la voie pro-apoptotique de UNC5B (**Figure 17A**).

Bien que nous nous sommes assurés au préalable que la mort cellulaire induite dans notre modèle touchait l'intégralité des cellules, les résultats de ce type de crible sont généralement accompagnés par un bruit de fond dû aux faux positifs. Pour limiter ce bruit de fond, nous avons ajouté à la condition d'induction de mort une condition contrôle, où les mêmes cellules sont gardées dans les mêmes conditions de culture mais sans induction de UNC5B. Ce contrôle nous permet d'éliminer dans notre analyse les gènes pouvant être sur-représentés dans le résultat final, car leur invalidation provoque une augmentation de la prolifération par exemple. En plus de ce contrôle, nous disposons aussi d'un contrôle concernant les cellules à T0 (avant induction), nous permettant de connaître le taux de représentation des sgARNs de la librairie présente dans nos cellules au début de l'expérience. En effet, il est statistiquement possible que certains sgARNs ne soient pas représentés au départ car ils n'ont pas été infectés, ou car l'invalidation de leur gène cible est létale pour la cellule.

Afin d'identifier les partenaires après induction, l'ADN des cellules survivantes est ensuite extrait, et les séquences codant pour les sgARNs sont ensuite amplifiées par PCR, puis identifiées par séquençage haut débit. Le séquençage de nouvelle génération a été réalisé par la plateforme de séquençage de l'IGFL (Institut de Génomique Fonctionnel de Lyon) en utilisant l'Ion PI HiQ Chef Kit et l'Ion PI HiQ chip v3 (100pb-80M reads) sur Ion Torrent platform (Thermo Fischer Scientific). Les échantillons des cellules induites pour UNC5B et des deux contrôles ont été rassemblés sur la puce de séquençage. Après séquençage, chacune des conditions a pu être triée en fonction de séquences codes barre ajoutés pendant l'étape

d'amplification par PCR. Les séquences ont ensuite été traitées pour garder uniquement les séquences de sgARNs, en éliminant les séquences incorrectes, et en rognant les séquences entourant le sgARN. Les séquences ont ensuite été alignées sur les séquences de la base de données de la librairie GeCKO (95% d'identité sur 90% de la longueur (22bp)). Cela a permis à l'IGFL de nous fournir une liste avec le nombre de reads pour chacun des sgARNs dans chacune des conditions expérimentales.

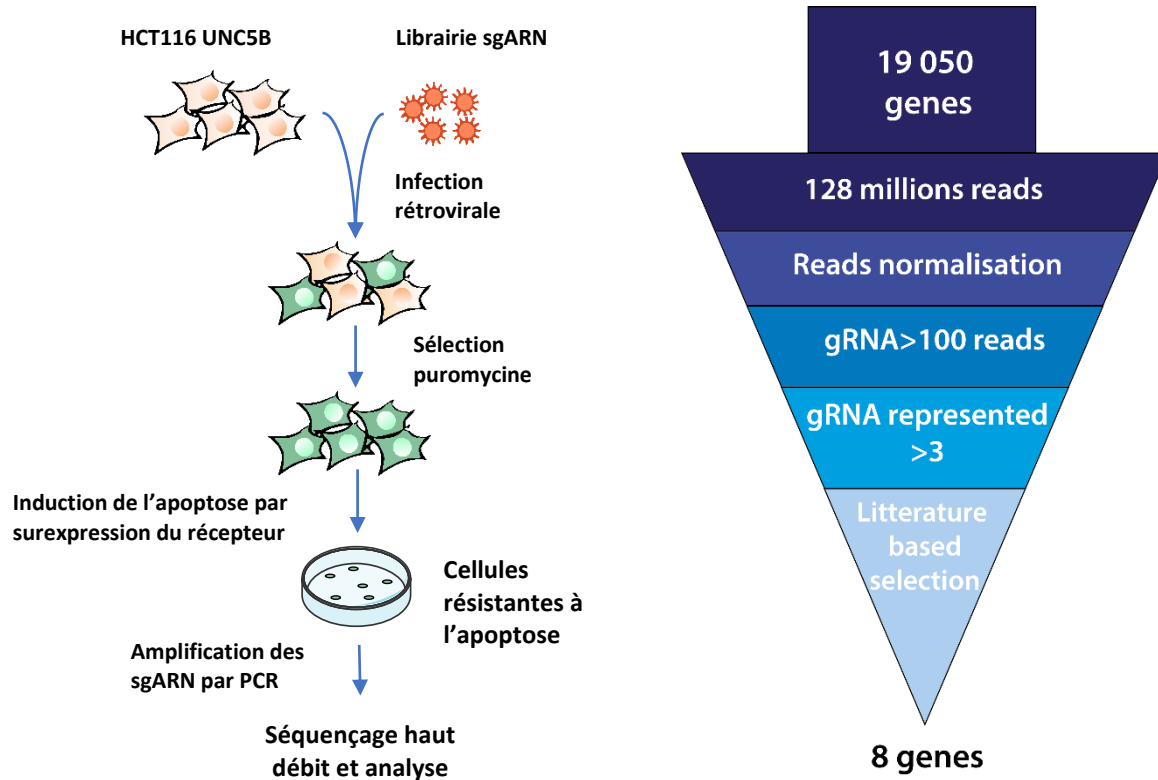


Figure 17 : Processus suivi pour la réalisation du criblage CRISPR-Cas9

(A) Processus expérimental

(B) Analyse bio-informatique

Pour chacune des conditions, nous avons normalisé le nombre de reads par rapport au nombre total de reads dans la condition. Nous avons ensuite normalisé les reads de la condition de mort induite par UNC5B à la condition contrôle, en soustrayant le nombre de reads ($\text{Nb reads condition de mort (gène X)} - \text{Nb reads condition contrôle (gène X)}$). Nous avons ensuite sélectionné les séquences de sgARNs dont le nombre de reads était supérieur à 100, puis les gènes avec plus de 3 séquences de sgARN représentées. Parmi les partenaires restants, nous avons ensuite fait une sélection sur une base bibliographique, en choisissant

des partenaires connus pour être liés à des processus apoptotiques, mais aussi des partenaires peu décrits dans la littérature, dans l'objectif d'apporter un regard neuf sur ces voies de mort (**Figure 17B**). Ces partenaires ont ensuite été validés fonctionnellement, par le biais de différents tests de mort cellulaire.

2. CrispR vs SiRNA

L'approche que nous avons choisie initialement pour valider les partenaires identifiés par le screening a été de simplement utiliser les séquences CRISPR du screening pour chacun des gènes à valider. A l'aide de ces séquences, nous avons réalisé un knock-out individuel pour chacun des gènes à valider. Cependant, nous nous sommes vite heurtés à plusieurs écueils en choisissant cette stratégie.

Tout d'abord, la génération de lignées stables CRISPR requiert une mise en place longue et un investissement horaire important. Dans le cas de CRISPR, le knock-out des lignées polyclonales générées n'est pas complet du fait du système de réparation homologue pouvant amener à une réparation correcte ou à une mutation silencieuse. La génération de clones est donc une étape incontournable, qui devra être suivi d'une étape de validation.

Pour la validation du knock-out, il est généralement nécessaire de faire une validation au niveau protéique, car le système CRISPR-Cas9 n'aura souvent que peu d'impact au niveau de la transcription des gènes en ARN messagers. Le coût de cette validation est donc non négligeable dans le cas d'un screening aboutissant à l'exploration de nombreuses pistes, avec une quantité importante de partenaires potentiels.

Enfin, il faut prendre en compte la possibilité d'une adaptation cellulaire conséquente à la mise en place de lignée knock-out stables. Les cellules peuvent subir une pression sélective résultante de la perte de fonction du gène cible, aboutissant à l'altération de voies de signalisations permettant à la cellule de compenser cette perte et de s'adapter. Ce problème a déjà été mis en lumière dans plusieurs modèles tel que la levure (Teng et al., 2013), le poisson zèbre (Rossi et al., 2015) ou encore la souris (Barbaric et al., 2007). Ce phénomène a aussi été décrit dans les lignées cellulaire (Cerikan et al., 2016), où le knock-out aboutit à un phénotype différent du knock-down par interférence ARN.

Pour ces raisons, nous avons fait le choix de changer de stratégie et de valider nos partenaires par interférence ARN, car la facilité de mise en place de cette technique ainsi que la possibilité de valider son efficacité par qPCR convenait beaucoup mieux à notre problématique. De plus, il paraît intéressant de coupler les résultats d'un knock-out à un knock-down. Si les deux techniques aboutissent au même résultat phénotypique, le gène validé a de bonnes chances d'être impliqué. Pour prévenir de faux positifs dus aux possibles effets aspécifiques des siARNs, nous avons fait le choix d'utiliser deux séquences différentes de siARNs pour valider l'implication de nos partenaires potentiels.

3. Tests de mort cellulaire

Pour valider fonctionnellement l'implication des différents partenaires dans l'apoptose induite par UNC5B, nous avons utilisé différents types de tests de mort cellulaire. Certaines caractéristiques liées à l'apoptose se retrouvent parfois dans d'autres types de morts cellulaires, il est donc nécessaire de combiner plusieurs tests pour s'assurer que la mort que l'on observe est apoptotique.

Par exemple, les cellules mortes voient leur perméabilité membranaire altérée, ce qui permet l'entrée de marqueur de l'ADN tel que l'iodure de propidium (IP). Le marquage à l'IP constitue donc une méthode efficace pour quantifier les cellules mortes, mais ne convient cependant pas pour différencier les cellules en apoptose des cellules en nécrose, car ces deux formes de mort voient leur intégrité membranaire altérée. De plus, seuls les stades tardifs de l'apoptose seront détectés, car la perméabilisation membranaire se produit à la fin du processus de mort. Toutefois, il s'agit d'un marquage très simple à mettre en place et peu coûteux, et nous avons donc fait le choix de l'utiliser en association avec une technologie d'imagerie en temps réel, l'Incucyte (Essen Bioscience), nous permettant ainsi d'obtenir une cinétique de l'incorporation de IP, et donc de la mort au cours du temps. Ce test nous a ainsi permis de cribler rapidement et de manière peu coûteuse les différents partenaires étudiés. De plus, l'obtention d'une cinétique nous permet de caractériser la mort au cours du temps, et ainsi de définir les temps adaptés pour l'acquisition des autres tests de mort.

Pour définir plus particulièrement l'apoptose, nous avons mis en place deux autres techniques spécifiques des caractéristiques de ce type de mort. La fragmentation de l'ADN

est observée grâce à une technique d'analyse du cycle cellulaire par cytométrie en flux. Les cellules sont d'abord perméabilisées à l'aide d'éthanol 70%, qui va perméabiliser les membranes plasmiques et nucléaires, puis marqué à l'IP. Ce marquage sera proportionnel à la quantité d'ADN dans la cellule. Les cellules en apoptose, dont une partie de l'ADN fragmenté se sera échappé de la cellule perméabilisée, présenteront ainsi une moins grande quantité d'ADN que les cellules en phase G1, en phase répllicative (S) ou en phase G2 (**Figure 18**). Ces cellules sont donc dans une phase appelée Sub-G1, qui donne son nom à la technique, et qui correspond à une partie des cellules mortes dans l'échantillon cellulaire. Le plus gros désavantage de cette technique est qu'il ne permet pas de quantifier précisément la totalité des cellules en apoptose. En effet, les cellules dont l'apoptose est déclenchée au cours de la phase de réplication ou de la phase G2 se retrouveront mélangées aux phases G1 et Sub-G2 des cellules saines.

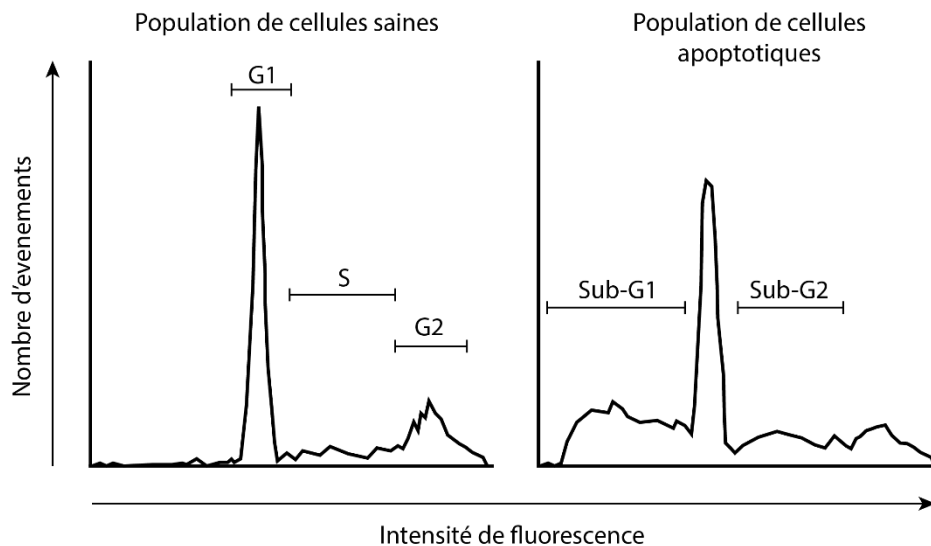


Figure 18 : Evaluation de l'apoptose par analyse du cycle cellulaire, la méthode Sub-G1

L'activation des caspases est observée par la mesure de l'activité caspase, grâce à un fluoromètre. Les caspases sont extraites de l'échantillon de cellules d'intérêt, et sont mises en présence d'un substrat spécifique de la caspase mesurée. Ce substrat est alors clivé et produit de la fluorescence qui sera alors proportionnelle à l'activité caspase de l'échantillon. La mesure des caspases 3/7, 8 et 9 est possible, permettant en plus de caractériser le type d'apoptose entrant en jeu. La mesure de l'activité caspase présente malgré tout le défaut

d'être très variable en fonction du temps après induction de la mort choisi pour effectuer la mesure. Dans le cas des caspases 3/7, il est possible de pallier cet inconvénient en mesurant l'activation des caspases au cours du temps à l'aide de l'Incucyte en utilisant un réactif spécifique. Le cout de ce réactif reste conséquent, cette technique n'est donc pas utilisée de manière exploratoire.

En complément de ces tests, nous avons mesuré l'intégrité mitochondriale dans nos échantillons cellulaires à l'aide du test JC1. Effectué pendant l'induction de l'apoptose, ce test permet de définir si la voie intrinsèque de l'apoptose est impliquée. Les cellules sont marquées à l'aide un colorant cationique lipophile JC1 qui va s'accumuler dans la matrice mitochondriale chargée négativement. A de fortes concentrations, le JC1 s'agrège et émet une fluorescence rouge. Lorsque la mitochondrie est perméabilisée à la suite d'un processus apoptotique, le JC1 est relargué dans le cytoplasme, se désagrège et émet une fluorescence verte sous forme monomérique. Le passage d'une fluorescence rouge à une fluorescence verte permet donc d'observer la perméabilisation mitochondriale (**Figure 19**). Comme pour le test caspase, le moment de la mesure est important car une perméabilisation mitochondriale peut se produire à des stades tardifs d'une mort cellulaire ne nécessitant pas la perméabilisation mitochondriale.

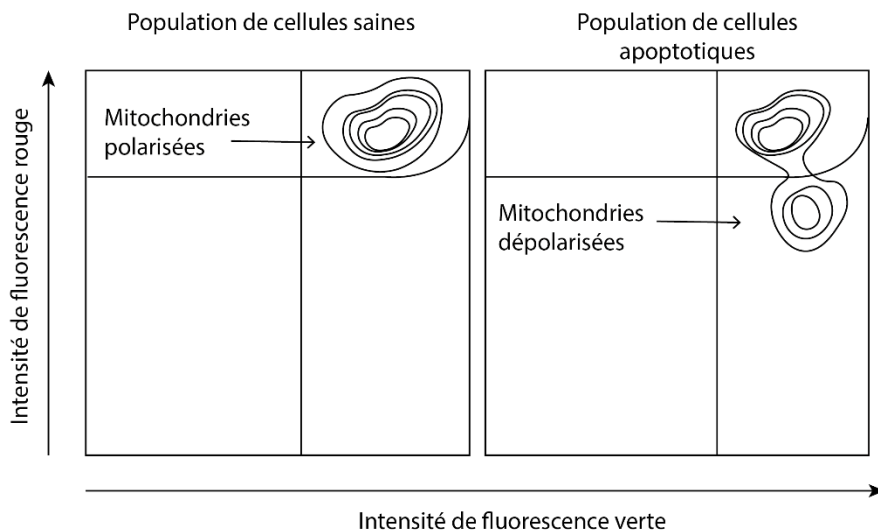


Figure 19 : Evaluation de la perméabilisation mitochondriale par la méthode JC1

Résultats

Pour exposer les résultats obtenus au cours de ce projet, j'ai fait le choix de les présenter sous la forme d'une publication scientifique. Il s'agit là d'une ébauche, et de nombreux points sont à améliorer dans l'objectif d'une publication réelle. Par exemple, plusieurs expérimentations sont encore à réaliser pour mieux caractériser la dégradation et l'ubiquitination de Mcl-1, et certains résultats doivent être répétés pour effectuer une analyse statistique.

Dependence receptor UNC5B triggers Mcl-1 degradation through the ubiquitin proteasome system

Ambroise Manceau¹, Lisa Frydman¹, David Neves², Marie Cresson³, David Goldschneider², Carine Maisse³, Patrick Mehlen¹^{\$} and Andrea Paradisi¹^{\$}

¹Apoptosis, Cancer and Development Laboratory - Equipe labellisée 'La Ligue', LabEx DEVweCAN, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, INSERM U1052-CNRS UMR5286, Université de Lyon, Université Claude Bernard Lyon1, Centre Léon Bérard, 69008 Lyon, France.

²Netris Pharma, 69008 Lyon.

³IVPC UMR754 INRA, Université de Lyon, Université Claude Bernard Lyon1, EPHE, Lyon, France.

^{\$}Co-senior and Corresponding authors: patrick.mehlen@lyon.unicancer.fr or andrea.paradisi@lyon.unicancer.fr

Abstract

The dependence receptor UNC5B triggers apoptosis in the absence of its ligand netrin-1, thus modulating tumor suppression. Indeed, interference with the binding between netrin-1 and UNC5B is a promising anti-tumor strategy and a monoclonal neutralizing antibody targeting netrin-1 is actually in clinical trial. To decipher the pro-apoptotic pathways activated by UNC5B, we performed a CRISPR-Cas9 screening and we identified COMMD2 and Cullin-RING-ligase (CRL) E3 ubiquitin ligase complex as mediators of UNC5B apoptosis. In presence of UNC5B, we showed that this complex ubiquitinates and targets for proteasomal degradation the anti-apoptotic Bcl-2 family protein Mcl-1, triggering the intrinsic apoptotic pathway. Inactivation of COMMD2 or CRL is then sufficient to inhibit UNC5B-mediated apoptosis and tumor suppression activity. We propose that UNC5B activation, via treatment with anti-netrin-1 antibody, could be a valid therapeutic strategy to inhibit Mcl-1 alone or in combination with BH3-mimetics, in order to decrease toxicity and resistance observed with these compounds.

Introduction

The balance between survival and death is crucial for the homeostasis of organisms. In the process of intrinsic apoptosis, this balance is controlled by the interactions of the Bcl-2 family proteins, consisting of pro-apoptotic effectors BAX, BAK and BOK, pro-apoptotic BH3-only protein (including BAD, BID, PUMA, BIM and NOXA), and anti-apoptotic Bcl-2 protein (including BCL-2, BCL-XL, MCL-1, BCL-W, BFL-1/A1) (Singh et al., 2019). In cancer, the equilibrium of this balance is shifted towards pro-survival Bcl-2 members, that are often overexpressed and stabilized (Delbridge et al., 2016). Hence, Bcl-2 members allow cancer cell to achieve evasion of cell death, which is a crucial step in order to acquire malignant phenotype (Hanahan and Weinberg, 2000; Juin et al., 2013). Cells protected by anti-apoptotic Bcl-2 members are often “primed” for apoptosis, because of oncogenic stress and stabilization of BH3-only proteins (Adams and Cory, 2018; Mérimo et al., 2012). Thus, therapeutic strategies targeting anti-apoptotic Bcl-2 protein are relevant, and selective and potent inhibitors of their members have been developed these last decades (Merino et al., 2018). Those inhibitors, named “BH3 mimetics”, are mainly efficient to treat hematopoietic cancers which display high levels of Bcl-2 family proteins (Ewald et al., 2019; Scheffold et al., 2018). However, combination of different BH3 mimetics could be an interesting lead to treat a broader panel of tumors, including solid tumors, which rely on more than one Bcl-2 proteins for their survival (Soderquist et al., 2018). To date, only the Bcl-2 specific inhibitor Venetoclax/ABT199 is approved (Souers et al., 2013b), and just a few molecules targeting the other members of the Bcl-2 family reached the clinic, such as the Mcl-1 inhibitor S63845 (Kotschy et al.,

2016b). Indeed, biochemical limitations and relative toxicity on healthy hematopoietic cells hindered the development of these components (Ashkenazi et al., 2017; Opferman et al., 2005; Zhang et al., 2007). Therefore, new leads allowing to target specifically members of the Bcl-2 family directly in the tumors are of great interest.

UNC5B/UNC5H2 (UNCoordinated Homolog 5) is a receptor able to actively induce apoptosis when unbound to its ligand, netrin-1 (Llambi et al., 2001). This characteristic defines all the members of the dependence receptor family, which are able to induce a bivalent signaling. In the presence of their ligand, they induce a "positive" signaling pathway, such as signals of proliferation or migration, whereas in the absence of their specific ligand, they induce a "negative" signaling pathway leading to cell death (Negulescu and Mehlen, 2018). Hence, the expression of these receptors renders the cell dependent on the presence of their respective ligands in order to survive (Mehlen and Puisieux, 2006). Up to now, the dependence receptor family consists of more than 20 members (Goldschneider and Mehlen, 2010), including netrin-1 receptors UNC5H (i.e., UNC5H1, UNC5H2, UNC5H3 and UNC5H4) and DCC (Llambi et al., 2001; Mehlen et al., 1998), the Sonic Hedgehog Homolog receptors Patched and cell adhesion molecule-related/downregulated by oncogenes (CDON) (Delloye-Bourgeois et al., 2013; Thibert et al., 2003), Kremen1 (Causeret et al., 2016), Notch3 (Lin et al., 2017), and recently, the tyrosine kinase receptor c-Kit (Wang et al., 2018).

UNC5B, along with netrin-1, were shown to have pleiotropic effects, ranging from axon guidance migration to angiogenesis (Lai Wing Sun et al., 2011). Furthermore, netrin-1 is also considered as a survival factor, allowing to block UNC5B pro-apoptotic activity (Llambi et al., 2001). In a pathological context, UNC5B could act as a tumor suppressor,

because of its dependence receptor features (Thiebault et al., 2003). Tumor cells developing in excess or outside their tissue of origin would be eliminated by lack of ligand availability. Therefore, loss of UNC5B receptor has been reported in several human cancers, including breast, stomach, lung, uterus and bladder cancer (Thiebault et al., 2003), allowing tumor cells to overcome its tumor suppressive effect. In numerous cases, tumor cells acquire the ability to express the ligand netrin-1 in an autocrine manner. Netrin-1 levels increase in colorectal cancer (Paradisi et al., 2008; Paradisi et al., 2009), metastatic breast cancer (Fitamant et al., 2008), in lung cancer (Delloye-Bourgeois et al., 2009a), neuroblastomas (Delloye-Bourgeois et al., 2009b), and melanomas (Boussouar et al., 2020). In these models, interference between netrin-1 and its receptors was sufficient to induce tumor regression. According to these findings, a monoclonal antibody neutralizing netrin-1, called NP137, was developed by Netris Pharma in order to target tumors presenting an increase in netrin-1 levels (Grandin et al., 2016) and is actually in a phase I/II clinical trial.

In addition to ligand upregulation and receptor loss, modification of the pro-apoptotic pathway of UNC5B could represent another selective advantage acquired by tumor cells. To date, little is known about the apoptotic signaling triggered by UNC5B. Upon netrin-1 deprivation, UNC5B adopts an open conformation, allowing phosphatase PP2A to catalyze dephosphorylation of DAPK (serine/threonine Death-Associated Protein Kinase), which in turn induces cell death by still unknown mechanisms (Guenebeaud et al., 2010; Llambi et al., 2005). Understanding this pathway would bring a new sight allowing us to identify the pathological context in which NP137 antibody should better induce cell death and tumor regression.

To identify the pro-apoptotic partners of UNC5B, we took advantage of a CRISPR-Cas9-based screen. We identified here the CRL3-COMMD2 complex as a crucial mediator needed for UNC5B-induced apoptosis. In presence of disengaged UNC5B, this complex ubiquitinated the anti-apoptotic Bcl-2-member Mcl-1, targeting for proteasomal degradation. Consequently, decreased levels of Mcl-1 triggered mitochondrial depolarization and activation of the intrinsic apoptotic pathway. Moreover, we propose here that NP137 treatment could be used as a specific Mcl-1 inhibitor in tumor patients, to be used in combination with BH3-mimetics to overcome toxicity associated with this kind of compounds.

Results

COMMD2 is required for UNC5B-induced cell death and tumor suppression

To decipher the pro-apoptotic pathways triggered by UNC5B, we generated a stable colorectal cancer HCT116 cell line, inducible for UNC5B, using sleeping beauty-based vectors. Forced UNC5B expression upon doxycycline treatment, confirmed by western blot (Figure S1A), strongly induced apoptotic cell death, as revealed by PI incorporation (Figure 1A), DNA fragmentation (Figure 1B) and caspase-3 activity (Figure 1C), compared to cells stable transfected with empty vector. This intense sensibility to UNC5B induction indicates the presence of a functional pro-apoptotic UNC5B signaling in HCT116 cells. To confirm that UNC5B-induced apoptosis was not merely due to protein over-expression, we stably expressed the ligand netrin-1 in HCT116 cells inducible for UNC5B. The constitutive presence of netrin-1 was sufficient to inhibit apoptosis observed upon UNC5B induction (Figures 1B and 1C).

We used stable HCT116 cell line, inducible for UNC5B, to perform a CRISPR-Cas9-based screening, allowing the identification of UNC5B pro-apoptotic partners. Between the advantages of this technique, there is also the possibility to identify proteins involved in a particular molecular signaling cascade, even if they are not able to interact together. This is not possible, for example, using an interaction-based screening, such as yeast two-hybrid screen. To this purpose, we transduced sleeping beauty-modified HCT116 cells with a genome-wide lentiviral library (GeCKO library, (Sanjana et al., 2014; Shalem et al., 2014)). Upon doxycycline treatment and UNC5B induction, exclusively cell clones knocked-out of a gene required for UNC5B pro-apoptotic signaling will survive

(Figure 1D). Using Next Generation Sequencing (NGS), we identified inactivated genes in cell clones. Considering all genes presenting at least three small guide RNAs (sgRNAs) enriched compared to control cells and identified in more than 100 reads (Figure 1E), we identified 75 genes. Intriguing, gene ontology analysis of all genes enriched in doxycycline-treated cells identified several proteins involved in ubiquitin binding (Figure 1F).

Upon a literature-based selection we highlighted eight genes, listed in Figure S1B. In particular, we focused on the copper metabolism Murr1 domain-containing protein 2 (COMMD2), a protein belonging to COMMD family, sharing a C-terminal COMM domain that mediates protein-protein interactions (Burstein et al., 2005). Although several reports account for a regulation of protein stability and activity of the homologue COMMD1 (Riera-Romo, 2018), little is known about the function of other family members, such as COMMD2. To confirm whether COMMD2 is required to UNC5B-induced cell death, we first generated stable HeLa cell lines, inducible for UNC5B. We selected a stable cell clone, expressing high levels of UNC5B upon doxycycline treatment (Figure S2A), and we confirmed a strong apoptotic cell death in doxycycline-treated cells, as evaluated by increases of DNA fragmentation (Figure S2B), caspase-3 activation (Figures S2C and S2D) and PI-positive cells (Figure S2E). Moreover, constitutive expression of netrin-1 or caspase inhibition by pan-caspase inhibitor Q-VD-OPh completely revert apoptosis induction by UNC5B (Figure S2B). Next, we transfected stable HeLa and HCT116 cells with two distinct siRNA targeting COMMD2 (Figures S3A, S3B and **S3C**). Interference with COMMD2 gene expression was sufficient to decrease DNA fragmentation upon UNC5B challenge with doxycycline, compared to cells transfected with control siRNA

(Figure 2A and S3D). Moreover, COMMD2 silencing inhibited the severe increase of PI-positive HeLa cells, triggered by UNC5B over-expression (Figure 2B), as well as caspase-3 activation observed in control cells (Figure 2C). In addition, transfection of a specific siRNA targeting COMMD1 was not able to modulate UNC5B-induced cell death in stable HeLa cells (Figures S3E and S3F), suggesting a specific role of COMMD2 in UNC5B pro-apoptotic pathways.

We then assessed whether COMMD2 could also modulate the tumor suppression function of UNC5B. For this purpose, we took advantage of the lung cancer H322 cell line, expressing high levels of netrin-1 and UNC5B, as well as COMMD2 (Figure S3G and (Delloye-Bourgeois et al., 2009a)). Several reports pointed out that netrin-1 inhibition, through RNA silencing or interference with the binding of its receptors, is a promising therapeutic strategy, inducing cell death in cancer cells expressing netrin-1 (Delloye-Bourgeois et al., 2009a; Delloye-Bourgeois et al., 2009b; Fitamant et al., 2008; Paradisi et al., 2013; Paradisi et al., 2009). To confirm the role of both UNC5B and COMMD2 on tumor suppression induced by netrin-1 inhibition, we stably knocked-out these two genes in H322 cells, using CRISPR-dCas9-KRAB, a modified CRISPR-Cas9-based system (Gilbert et al., 2013; Thakore et al., 2015) COMMD2 and UNC5B down-regulation was verified by Western blot and quantitative PCR analyses in stably transduced H322 cells (Figures S3G and S3H). **Transfection of an siRNA targeting netrin-1 in these stable knocked-out cells, while triggering apoptosis in control cells, had no effect on COMMD2 and UNC5B stable cell lines, confirming *in vitro* that both the genes were required for apoptosis triggered by netrin-1 inhibition in H322 cells (Figure SXX).** Next, we assessed the requirement of COMMD2 and UNC5B on tumor suppression associated with netrin-1

inhibition. For this purpose, we investigated the effect of NP137, a neutralizing anti-netrin-1 antibody able to induce cancer cell death and tumor regression in several preclinical models (Boussouar et al., 2020; Grandin et al., 2016), on stable knocked-out H322 cells engrafted in *nude* mice. Treatment of mice with NP137 antibody strongly inhibited tumor growth in control cells, however tumors knocked-out of COMMD2 or UNC5B were less sensitive to anti-netrin-1 antibody, as revealed by both tumor growth curves and the percentage of tumor growth inhibition (Figures 2D and 2E). We confirmed that the tumor suppression activity of NP137 antibody was due to apoptosis induction, as demonstrated by immunohistochemical staining of cleaved, active caspase-3 (Figure 2F). Interestingly, in tumors knocked-out for COMMD2 or UNC5B we failed to detect a similar increase in the percentage of caspase-3 positive cells upon treatment with NP137 antibody (Figure 2F).

UNC5B-induced cell death requires the formation of a COMMD2-regulated ubiquitin-ligase complex

Having confirmed the necessity of COMMD2 in the pro-apoptotic and tumor suppressor activities of UNC5B, we next studied the molecular events involved in this regulation. Gene ontology analysis of CRISPR-Cas9 screening on HCT116 cells revealed the involvement of several ubiquitin-ligase proteins on UNC5B-induced cell death (see Figure 1F). Moreover, COMMD proteins interact with different Cullins, which in turn associate with RING box proteins (RBX1 or RBX2) to form an E3 ubiquitin ligase complex, known as Cullin-RING ligases (CRLs), which control the stability of many proteins (Mao et al., 2011). Even though it has been proposed that COMMD1 could regulate the binding

to CRLs of the natural inhibitor CAND1 (Cullin-associated Nedd8-dissociated Protein 1, (Mao et al., 2011)), how other COMMD proteins could modulate protein ubiquitination by CRLs is unknown. Of interest, COMMD2, conversely to COMMD1, interacts preferentially with Cullin-3 (CUL3) (Mao et al., 2011) that forms with RBX proteins the ubiquitin ligase complex CRL3. To unravel whether COMMD2/CRL3 complex could affect cell death induced by UNC5B, we transfected siRNAs targeting RBX1 and CUL3 in stable HeLa cells inducible for UNC5B. While in scramble-transfected cells UNC5B induction upon doxycycline treatment triggered DNA fragmentation, silencing of either RBX1 or CUL3 was sufficient to inhibit apoptosis induction (Figures 3A and S4A). In a similar way, we observed the decreases of caspase-3 activity and PI-positive cells upon interfering with RBX1 or CUL3 gene expression (Figures 3B and 3C), confirming the crucial role of CRL3 on UNC5B-induced apoptosis. Moreover, silencing of CUL2, preferentially binding COMMD1 (Mao et al., 2011), had no effect on the cell death triggered by UNC5B (Figures S4B and S4C). These data suggest the formation of a specific protein complex between COMMD2 and CRL3 in presence of UNC5B, allowing activation of ubiquitin ligase activity. Knowing that activation of CRLs requires the covalent conjugation of the protein NEDD8 (neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 8) (Duda et al., 2008), a process called NEDDylation (Enchev et al., 2015), we wondered whether COMMD2/CRL3 interaction could involve this event. Indeed, treatment of stable HeLa cells with pevonedistat, an inhibitor of NEDDylation (Soucy et al., 2009), suppressed apoptosis induced by UNC5B (Figures 3D and S4D). As protein ubiquitination requires the recruitment of E2 ubiquitin-conjugating enzymes from E3 complex, such as CRL3, to confirm the necessity of this process in UNC5B-induced cell death we next investigate which E2 enzymes could be involved. CRISPR-Cas9 screening identified two E2

enzymes, UBE2L6 and UBE2H, both presenting four sgRNAs enriched upon doxycycline challenge (data not shown). Upon transfection of siRNA targeting this two E2 enzymes in stable HeLa cells, we confirmed that silencing UBE2L6, but not UBE2H, decreased DNA fragmentation observed upon UNC5B induction (Figures 3E and S4E).

UNC5B triggers proteasomal degradation of Mcl-1

Considering that we demonstrated that UNC5B-induced cell death required the activation of the E3 ubiquitin-ligase complex CRL3, we hypothesized that UNC5B could lead to ubiquitination and consequent proteasomal degradation of unknown target proteins. Indeed, treatment of stable HeLa cells with proteasome inhibitors MG132 and bortezomib suppressed DNA fragmentation and caspase-3 activation triggered by UNC5B induction (Figures 4A and 4B). Looking for UNC5B target proteins, degraded during apoptosis induction, we focused on the Bcl-2 family members, anti-apoptotic proteins whose cellular abundance is regulated via the ubiquitin-proteasome system (Kale et al., 2018; Singh et al., 2019). Western blot analysis revealed a specific decrease of Mcl-1 protein upon UNC5B induction in stable HeLa cells, while we reported no change on Bcl-2 and Bcl-XL protein levels (Figure 4C). Moreover, treatment with proteasome inhibitor bortezomib increased Mcl-1 protein levels in both untreated and doxycycline-treated cells. Interestingly, inhibition of caspase activity, by means of Q-VD-OPh, was not sufficient to prevent Mcl-1 degradation triggered by UNC5B, even though is adequate to restrain apoptosis induction (Figures 4A and 4C). **In addition, we demonstrated that UNC5B-dependent degradation of Mcl-1 occurred at a protein level, as UNC5B induction did not affect Mcl-1 and other Bcl-2 family members transcriptional levels, evidenced by**

quantitative PCR analysis (Figure 4D). Inactivation of COMMD2/CRL3 complex, by silencing COMMD2 or RBX1 gene expression, constrained Mcl-1 degradation in doxycycline-treated HeLa cells (Figure 4E). Taken together, these results suggest that UNC5B drives proteasomal degradation of Mcl-1 through ubiquitin-ligase activity of the COMMD2/CRL3 complex.

UNC5B-mediated Mcl-1 degradation induces MOMP and caspase-9 activation

Mcl-1, as well as other Bcl-2 family members, acts as an anti-apoptotic protein by inhibiting the pro-apoptotic proteins BCL2 associated X, apoptosis regulator (BAX) and BCL2 antagonist/killer 1 (BAK1) and the consequent mitochondrial outer membrane permeabilization (MOMP) (Galluzzi et al., 2018a). Following the cytoplasmic release of apoptotic factors residing in the mitochondrial intermembrane space, a pro-apoptotic complex, called apoptosome, is formed, leading to caspase-9 activation and consequent execution of the intrinsic apoptotic program. Having shown that UNC5B triggered Mcl-1 degradation, we could suppose that apoptosis induced by UNC5B should require MOMP and caspase-9 activation. Indeed, silencing of caspase-9 in stable HeLa cells rescued the strong increase of PI-positive cells upon UNC5B induction (Figure 5A and S5A), as well as DNA fragmentation and caspase-3 activity (Figures 5B and 5C). Conversely, transfection of siRNAs targeting caspase-8 (the effector caspase involved in the extrinsic apoptotic pathway) unaffected UNC5B-induced cell death (Figure S5B and S5C). Moreover, UNC5B triggered caspase-9, and not caspase-8, activation in stable HeLa cells, as shown by caspase activity, performed using specific fluorescent substrate (Figure 5D).

Having demonstrated that Mcl-1 degradation requires the activation of COMMD2/CUL3 complex by UNC5B, we determined whether UNC5B-dependent caspase-9 activation was consequent to this event. Stable HeLa cells were transfected with siRNA targeting COMMD2, CUL3 and RBX1, as well as caspase-9 as a positive control. Silencing the expression of COMMD2/CUL3 member complex completely suppressed caspase-9 activation observed upon UNC5B induction in scrambled-transfected cells (Figure 5E). Moreover, treatment of stable HeLa cells with NEDD8 or proteasome inhibitors (Figure 5F) was sufficient to prevent UNC5B-induced caspase-9 activation.

UNC5B-mediated activation of caspase-9, together with decreased Mcl-1 protein levels observed upon UNC5B induction, suggested that UNC5B could trigger apoptosis by provoking MOMP. Indeed, we confirmed this hypothesis in stable HeLa cells over-expressing UNC5B (Figure 5G). Interestingly, silencing of COMMD2 and RBX1 inhibited both MOMP and apoptosis triggered by UNC5B (Figures 5G and 5H). In contrast caspase-9 knock-down, even though suppressed apoptosis upon UNC5B induction (Figure 5H), was not sufficient to restrain mitochondria depolarization induced by UNC5B (Figures 5G). Moreover, transfection of siRNA targeting caspase-9 in stable HeLa cells did not prevent Mcl-1 degradation consequent to UNC5B induction (Figure 5I). These data confirmed that Mcl-1 degradation and MOMP triggered by UNC5B were not merely the effect of cellular perturbation consequent to UNC5B over-expression, as these events still occurred in stable HeLa cells knocking-down of caspase-9 and showing low apoptotic rate (Figures 5G and 5H). As confirmation, silencing of BAX and BAK1 (Figure S5D), upstream the molecular events driving apoptosis through Mcl-1 inhibition to MOMP and caspase-9

activation, decreased UNC5B-dependent apoptosis induction (Figure 5J), while they could not prevent counteract Mcl-1 inhibition observed in doxycycline-treated stable HeLa cells (Figure 5K).

Discussion

The dependence receptor UNC5B is able to conditionally induce apoptosis in cancer cells. Using a CRISPR-Cas9 screening, we identified the protein COMMD2 as a pro-apoptotic mediator of UNC5B-induced cell death. Our results allow to establish a predict model, detailed in Figure 6. In the absence of netrin-1, UNC5B triggers COMMD2 activation by still unknown mechanisms. Once activated, COMMD2 interacts with the CRL3 complex which then ubiquitinates Mcl-1 and causes its degradation by the proteasome. This results in a shift of the pro-apoptotic balance, leading to mitochondrial permeabilization and successive activations of caspase 9 and caspase 3 and finally to apoptosis of the cell. To date, several ubiquitin ligases are known to degrade Mcl-1, including Mule, SCF ^{β -TrCP}, SCF^{FBW7}, TRIM17, APC/C^{Cdc20}, MARCH5 and Parkin (Mojsa et al., 2014; Senichkin et al., 2020). However, CRL3 complex has never been described in this context. Here, for the first time, we demonstrate the involvement of this E3 ligase in the degradation of Mcl-1.

The E3 ligase family of CRLs is mainly regulated by a neddylation cycle, allowing their activation and inactivation (Duda et al., 2011). CRL E3 ligases are activated by covalent binding of an NEDD8 protein (Enchev et al., 2015). Subsequently NEDD8 can be dissociated from the complex by the action of the COP9 (constitutive photomorphogenesis 9) signalosome, which allows the CAND1 protein to interact with the non-neddylated complex and inhibit its activity (Duda et al., 2011). Interestingly COMMD1 inhibits the binding of CAND1 by associating with Cullin-2, and consequently activates the CRL2 complex (Mao et al., 2011). In addition, COMMD2 specifically interacts with Cullin-

3, but not Cullin-2 (Mao et al., 2011). Our data demonstrated that COMMD2, as well as the members of CRL3 complex, were required for cell death induced by UNC5B, whereas COMMD1 and other CRLs did not participate to UNC5B pro-apoptotic pathways. Furthermore, we were also able to demonstrate that inhibition of neddylation, via treatment with pevonedistat, a specific inhibitor of NEDD8, was able to reverse UNC5B-induced cell death. Since CAND1 binds and inhibits virtually all Cullins (Duda et al., 2011), we can thus hypothesize that COMMD2, by interacting specifically with CRL3, could inhibit the interaction of CAND1 with Cullin-3, and thus allow its activation by neddylation. However, how UNC5B favors COMMD2 interaction with CRL and activates these complexes remains unclear.

From a therapeutic point of view, our results suggest that interfering with the binding between netrin-1 and UNC5B, using the neutralizing anti-netrin-1 antibody NP137, could constitute an original means of degrading Mcl-1, thus providing an interesting alternative to the BH3-mimetics currently being developed. Indeed, the clinical progression of these compounds, in particular those targeting Mcl-1, has been slowed, because of on-target effect on healthy cells (Merino et al., 2018). Indeed, the presence of this anti-apoptotic protein is crucial in many tissues and cell types, including hematopoietic stem cells, thymus epithelium, mature and immature B and T lymphoid cells, activated T cells, cardiomyocytes, neural cells and hepatocytes (Merino et al., 2018). Preliminary tests on humanized Mcl-1 mice with S63845 revealed a decrease in the B-cell population during treatment, but an overall good tolerability (Brennan et al., 2018). Nonetheless, the recent suspension of a clinical study of two Mcl-1 inhibitors, AMG 176 (NCT02675452) and AMG 397 (NCT03465540), evaluating possible cardiac toxicity of these compounds still raises

some safety concerns (Wei et al., 2020). By degrading Mcl-1 in an indirect but specific way, NP137 antibody could be an attractive alternative to BH3-mimetic compounds. Indeed, the safety of this antibody has already been tested in clinical phase I, and has shown a very good tolerance in the patients tested. NP137, by preferentially targeting tumor cells overexpressing netrin-1, has a considerable advantage over chemical inhibitors, which indiscriminately target both tumor and healthy cells. The good tolerance of the antibody in patients offers the possibility of using it in combination with other molecules.

The use of BH3-mimetics targeting Mcl-1 in combination with other agents has been described in several contexts. For example, the use of Mcl-1 inhibitors has been shown to be effective in combination with EGFR, MEK or B-RAF inhibitors in different lung cancer subtypes (Kotschy et al., 2016b; Levenson et al., 2015a; Weeden et al., 2018), or in combination with HER2-targeted chemotherapies in breast cancer (Merino et al., 2017b). Moreover, another interesting approach could be to target other Bcl-2 family members in addition to Mcl-1. While the vast majority of solid tumors are resistant to the use of a single inhibitor targeting Bcl-2, Bcl-XL or Mcl-1, the combination of inhibition of two or even all three proteins is highly effective (Soderquist et al., 2018). The combination of Mcl-1 and Bcl-XL inhibitors, in particular, appears to be effective in a large portion of tumors and could be promising. However, this combination has been reported to be lethal in mouse models, due to acute liver toxicity (Weeden et al., 2018). Using the antibody against netrin-1 could replace BH3-mimetics targeting Mcl-1, and therefore decrease the toxicity of the co-treatment and allow combinations with other BH3 mimetics.

Acknowledgement

We wish to thank Benjamin Gillet, Frédéric Flamant and Sandrine Hughes,(Institut de Génomique Fonctionnelle de Lyon (IGFL)) for NGS. This work was supported by institutional grants from CNRS, University of Lyon, Centre Léon Bérard and from the Ligue Contre le Cancer, INCA, ANR, ERC and Fondation Bettencourt. Ambroise Manceau and Lisa Frydman has been supported by a fellowship from Ligue Contre le Cancer.

Conflict of Interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Adams, J.M., and Cory, S. (2018). The BCL-2 arbiters of apoptosis and their growing role as cancer targets. *Cell death and differentiation* *25*, 27-36.
- Ashkenazi, A., Fairbrother, W.J., Levenson, J.D., and Souers, A.J. (2017). From basic apoptosis discoveries to advanced selective BCL-2 family inhibitors. *Nature reviews Drug discovery* *16*, 273-284.
- Boussouar, A., Tortereau, A., Manceau, A., Paradisi, A., Gadot, N., Vial, J., Neves, D., Larue, L., Battistella, M., Leboeuf, C., *et al.* (2020). Netrin-1 and Its Receptor DCC Are Causally Implicated in Melanoma Progression. *Cancer research* *80*, 747-756.
- Brennan, M.S., Chang, C., Tai, L., Lessene, G., Strasser, A., Dewson, G., Kelly, G.L., and Herold, M.J. (2018). Humanized Mcl-1 mice enable accurate preclinical evaluation of MCL-1 inhibitors destined for clinical use. *Blood* *132*, 1573-1583.
- Burstein, E., Hoberg, J.E., Wilkinson, A.S., Rumble, J.M., Csomos, R.A., Komarck, C.M., Maine, G.N., Wilkinson, J.C., Mayo, M.W., and Duckett, C.S. (2005). COMMD proteins, a novel family of structural and functional homologs of MURR1. *The Journal of biological chemistry* *280*, 22222-22232.
- Causeret, F., Sumia, I., and Pierani, A. (2016). Kremen1 and Dickkopf1 control cell survival in a Wnt-independent manner. *Cell death and differentiation* *23*, 323-332.
- Delbridge, A.R., Grabow, S., Strasser, A., and Vaux, D.L. (2016). Thirty years of BCL-2: translating cell death discoveries into novel cancer therapies. *Nature reviews Cancer* *16*, 99-109.
- Delloye-Bourgeois, C., Brambilla, E., Coissieux, M.M., Guenebeaud, C., Pedoux, R., Firlej, V., Cabon, F., Brambilla, C., Mehlen, P., and Bernet, A. (2009a). Interference with netrin-1 and tumor cell death in non-small cell lung cancer. *Journal of the National Cancer Institute* *101*, 237-247.
- Delloye-Bourgeois, C., Fitamant, J., Paradisi, A., Cappellen, D., Douc-Rasy, S., Raquin, M.A., Stupack, D., Nakagawara, A., Rousseau, R., Combaret, V., *et al.* (2009b). Netrin-1 acts as a survival factor for aggressive neuroblastoma. *The Journal of experimental medicine* *206*, 833-847.

- Delloye-Bourgeois, C., Gibert, B., Rama, N., Delcros, J.G., Gadot, N., Scoazec, J.Y., Krauss, R., Bernet, A., and Mehlen, P. (2013). Sonic Hedgehog promotes tumor cell survival by inhibiting CDON pro-apoptotic activity. *PLoS biology* *11*, e1001623.
- Duda, D.M., Borg, L.A., Scott, D.C., Hunt, H.W., Hammel, M., and Schulman, B.A. (2008). Structural insights into NEDD8 activation of cullin-RING ligases: conformational control of conjugation. *Cell* *134*, 995-1006.
- Duda, D.M., Scott, D.C., Calabrese, M.F., Zimmerman, E.S., Zheng, N., and Schulman, B.A. (2011). Structural regulation of cullin-RING ubiquitin ligase complexes. *Current opinion in structural biology* *21*, 257-264.
- Enchev, R.I., Schulman, B.A., and Peter, M. (2015). Protein neddylation: beyond cullin-RING ligases. *Nature reviews Molecular cell biology* *16*, 30-44.
- Ewald, L., Dittmann, J., Vogler, M., and Fulda, S. (2019). Side-by-side comparison of BH3-mimetics identifies MCL-1 as a key therapeutic target in AML. *Cell death & disease* *10*, 917.
- Fitamant, J., Guenebeaud, C., Coissieux, M.M., Guix, C., Treilleux, I., Scoazec, J.Y., Bachelot, T., Bernet, A., and Mehlen, P. (2008). Netrin-1 expression confers a selective advantage for tumor cell survival in metastatic breast cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *105*, 4850-4855.
- Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S.A., Abrams, J.M., Adam, D., Agostinis, P., Alnemri, E.S., Altucci, L., Amelio, I., Andrews, D.W., *et al.* (2018). Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell death and differentiation*.
- Gilbert, L.A., Larson, M.H., Morsut, L., Liu, Z., Brar, G.A., Torres, S.E., Stern-Ginossar, N., Brandman, O., Whitehead, E.H., Doudna, J.A., *et al.* (2013). CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes. *Cell* *154*, 442-451.
- Goldschneider, D., and Mehlen, P. (2010). Dependence receptors: a new paradigm in cell signaling and cancer therapy. *Oncogene* *29*, 1865-1882.
- Grandin, M., Meier, M., Delcros, J.G., Nikodemus, D., Reuten, R., Patel, T.R., Goldschneider, D., Orriss, G., Krahn, N., Boussouar, A., *et al.* (2016). Structural Decoding of the Netrin-1/UNC5 Interaction and its Therapeutical Implications in Cancers. *Cancer cell* *29*, 173-185.

- Guenebeaud, C., Goldschneider, D., Castets, M., Guix, C., Chazot, G., Delloye-Bourgeois, C., Eisenberg-Lerner, A., Shohat, G., Zhang, M., Laudet, V., *et al.* (2010). The dependence receptor UNC5H2/B triggers apoptosis via PP2A-mediated dephosphorylation of DAP kinase. *Molecular cell* *40*, 863-876.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* *100*, 57-70.
- Huang, D.W., Sherman, B.T., Tan, Q., Kir, J., Liu, D., Bryant, D., Guo, Y., Stephens, R., Baseler, M.W., Lane, H.C., *et al.* (2007). DAVID Bioinformatics Resources: expanded annotation database and novel algorithms to better extract biology from large gene lists. *Nucleic acids research* *35*, W169-175.
- Juin, P., Geneste, O., Gautier, F., Depil, S., and Campone, M. (2013). Decoding and unlocking the BCL-2 dependency of cancer cells. *Nature reviews Cancer* *13*, 455-465.
- Kale, J., Osterlund, E.J., and Andrews, D.W. (2018). BCL-2 family proteins: changing partners in the dance towards death. *Cell death and differentiation* *25*, 65-80.
- Kotschy, A., Szlavik, Z., Murray, J., Davidson, J., Maragno, A.L., Le Toumelin-Braizat, G., Chanrion, M., Kelly, G.L., Gong, J.N., Moujalled, D.M., *et al.* (2016). The MCL1 inhibitor S63845 is tolerable and effective in diverse cancer models. *Nature* *538*, 477-482.
- Lai Wing Sun, K., Correia, J.P., and Kennedy, T.E. (2011). Netrins: versatile extracellular cues with diverse functions. *Development* *138*, 2153-2169.
- Levenson, J.D., Phillips, D.C., Mitten, M.J., Boghaert, E.R., Diaz, D., Tahir, S.K., Belmont, L.D., Nimmer, P., Xiao, Y., Ma, X.M., *et al.* (2015). Exploiting selective BCL-2 family inhibitors to dissect cell survival dependencies and define improved strategies for cancer therapy. *Science translational medicine* *7*, 279ra240.
- Lin, S., Negulescu, A., Bulusu, S., Gibert, B., Delcros, J.G., Ducarouge, B., Rama, N., Gadot, N., Treilleux, I., Saintigny, P., *et al.* (2017). Non-canonical NOTCH3 signalling limits tumour angiogenesis. *Nature communications* *8*, 16074.
- Llambi, F., Causeret, F., Bloch-Gallego, E., and Mehlen, P. (2001). Netrin-1 acts as a survival factor via its receptors UNC5H and DCC. *The EMBO journal* *20*, 2715-2722.
- Llambi, F., Lourenco, F.C., Gozuacik, D., Guix, C., Pays, L., Del Rio, G., Kimchi, A., and Mehlen, P. (2005). The dependence receptor UNC5H2 mediates apoptosis through DAP-kinase. *The EMBO journal* *24*, 1192-1201.

- Mao, X., Gluck, N., Chen, B., Starokadomskyy, P., Li, H., Maine, G.N., and Burstein, E. (2011). COMMD1 (copper metabolism MURR1 domain-containing protein 1) regulates Cullin RING ligases by preventing CAND1 (Cullin-associated Nedd8-dissociated protein 1) binding. *The Journal of biological chemistry* 286, 32355-32365.
- Mehlen, P., and Puisieux, A. (2006). Metastasis: a question of life or death. *Nature reviews Cancer* 6, 449-458.
- Mehlen, P., Rabizadeh, S., Snipas, S.J., Assa-Munt, N., Salvesen, G.S., and Bredesen, D.E. (1998). The DCC gene product induces apoptosis by a mechanism requiring receptor proteolysis. *Nature* 395, 801-804.
- Merino, D., Kelly, G.L., Lessene, G., Wei, A.H., Roberts, A.W., and Strasser, A. (2018). BH3-Mimetic Drugs: Blazing the Trail for New Cancer Medicines. *Cancer cell* 34, 879-891.
- Mérino, D., Strasser, A., and Bouillet, P. (2012). Bim must be able to engage all pro-survival Bcl-2 family members for efficient tumor suppression. *Oncogene* 31, 3392-3396.
- Merino, D., Whittle, J.R., Vaillant, F., Serrano, A., Gong, J.N., Giner, G., Maragno, A.L., Chanrion, M., Schneider, E., Pal, B., *et al.* (2017). Synergistic action of the MCL-1 inhibitor S63845 with current therapies in preclinical models of triple-negative and HER2-amplified breast cancer. *Science translational medicine* 9.
- Mojsa, B., Lassot, I., and Desagher, S. (2014). Mcl-1 ubiquitination: unique regulation of an essential survival protein. *Cells* 3, 418-437.
- Negulescu, A.M., and Mehlen, P. (2018). Dependence receptors - the dark side awakens. *The FEBS journal* 285, 3909-3924.
- Opferman, J.T., Iwasaki, H., Ong, C.C., Suh, H., Mizuno, S., Akashi, K., and Korsmeyer, S.J. (2005). Obligate role of anti-apoptotic MCL-1 in the survival of hematopoietic stem cells. *Science* 307, 1101-1104.
- Paradisi, A., Creveaux, M., Gibert, B., Devailly, G., Redoulez, E., Neves, D., Cleysac, E., Treilleux, I., Klein, C., Niederfellner, G., *et al.* (2013). Combining chemotherapeutic agents and netrin-1 interference potentiates cancer cell death. *EMBO molecular medicine* 5, 1821-1834.

- Paradisi, A., Maise, C., Bernet, A., Coissieux, M.M., Maccarrone, M., Scoazec, J.Y., and Mehlen, P. (2008). NF-kappaB regulates netrin-1 expression and affects the conditional tumor suppressive activity of the netrin-1 receptors. *Gastroenterology* *135*, 1248-1257.
- Paradisi, A., Maise, C., Coissieux, M.M., Gadot, N., Lepinasse, F., Delloye-Bourgeois, C., Delcros, J.G., Svrcek, M., Neufert, C., Flejou, J.F., *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*, 17146-17151.
- Riera-Romo, M. (2018). COMMD1: A Multifunctional Regulatory Protein. *Journal of cellular biochemistry* *119*, 34-51.
- Sanjana, N.E., Shalem, O., and Zhang, F. (2014). Improved vectors and genome-wide libraries for CRISPR screening. *Nature methods* *11*, 783-784.
- Scheffold, A., Jebaraj, B.M.C., and Stilgenbauer, S. (2018). Venetoclax: Targeting BCL2 in Hematological Cancers. *Recent results in cancer research Fortschritte der Krebsforschung Progres dans les recherches sur le cancer* *212*, 215-242.
- Senichkin, V.V., Streletskaja, A.Y., Gorbunova, A.S., Zhivotovsky, B., and Kopeina, G.S. (2020). Saga of Mcl-1: regulation from transcription to degradation. *Cell death and differentiation* *27*, 405-419.
- Shalem, O., Sanjana, N.E., Hartenian, E., Shi, X., Scott, D.A., Mikkelsen, T., Heckl, D., Ebert, B.L., Root, D.E., Doench, J.G., *et al.* (2014). Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells. *Science* *343*, 84-87.
- Singh, R., Letai, A., and Sarosiek, K. (2019). Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins. *Nature reviews Molecular cell biology* *20*, 175-193.
- Soderquist, R.S., Crawford, L., Liu, E., Lu, M., Agarwal, A., Anderson, G.R., Lin, K.H., Winter, P.S., Cakir, M., and Wood, K.C. (2018). Systematic mapping of BCL-2 gene dependencies in cancer reveals molecular determinants of BH3 mimetic sensitivity. *Nature communications* *9*, 3513.
- Soucy, T.A., Smith, P.G., Milhollen, M.A., Berger, A.J., Gavin, J.M., Adhikari, S., Brownell, J.E., Burke, K.E., Cardin, D.P., Critchley, S., *et al.* (2009). An inhibitor of NEDD8-activating enzyme as a new approach to treat cancer. *Nature* *458*, 732-736.

- Souers, A.J., Levenson, J.D., Boghaert, E.R., Ackler, S.L., Catron, N.D., Chen, J., Dayton, B.D., Ding, H., Enschede, S.H., Fairbrother, W.J., *et al.* (2013). ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets. *Nature medicine* *19*, 202-208.
- Thakore, P.I., D'Ippolito, A.M., Song, L., Safi, A., Shivakumar, N.K., Kabadi, A.M., Reddy, T.E., Crawford, G.E., and Gersbach, C.A. (2015). Highly specific epigenome editing by CRISPR-Cas9 repressors for silencing of distal regulatory elements. *Nature methods* *12*, 1143-1149.
- Thibert, C., Teillet, M.A., Lapointe, F., Mazelin, L., Le Douarin, N.M., and Mehlen, P. (2003). Inhibition of neuroepithelial patched-induced apoptosis by sonic hedgehog. *Science* *301*, 843-846.
- Thiebault, K., Mazelin, L., Pays, L., Llambi, F., Joly, M.O., Scoazec, J.Y., Saurin, J.C., Romeo, G., and Mehlen, P. (2003). The netrin-1 receptors UNC5H are putative tumor suppressors controlling cell death commitment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *100*, 4173-4178.
- Wang, H., Boussouar, A., Mazelin, L., Tauszig-Delamasure, S., Sun, Y., Goldschneider, D., Paradisi, A., and Mehlen, P. (2018). The Proto-oncogene c-Kit Inhibits Tumor Growth by Behaving as a Dependence Receptor. *Molecular cell* *72*, 413-425 e415.
- Weeden, C.E., Ah-Cann, C., Holik, A.Z., Pasquet, J., Garnier, J.M., Merino, D., Lessene, G., and Asselin-Labat, M.L. (2018). Dual inhibition of BCL-XL and MCL-1 is required to induce tumour regression in lung squamous cell carcinomas sensitive to FGFR inhibition. *Oncogene* *37*, 4475-4488.
- Wei, A.H., Roberts, A.W., Spencer, A., Rosenberg, A.S., Siegel, D., Walter, R.B., Caenepeel, S., Hughes, P., McIver, Z., Mezzi, K., *et al.* (2020). Targeting MCL-1 in hematologic malignancies: Rationale and progress. *Blood reviews* *44*, 100672.
- Zhang, H., Nimmer, P.M., Tahir, S.K., Chen, J., Fryer, R.M., Hahn, K.R., Iciek, L.A., Morgan, S.J., Nasarre, M.C., Nelson, R., *et al.* (2007). Bcl-2 family proteins are essential for platelet survival. *Cell death and differentiation* *14*, 943-951.

Figure Legends:

Figure 1. CRISPR-Cas9 screening identifies genes and molecular pathways involved in UNC5B-induced cell death

(A): UNC5B over-expression triggers cell death. Stable HCT116 cells inducible for human UNC5B were treated with the indicated amount of doxycycline in 48-well plate. Cell death was analyzed by propidium iodide (PI) staining up to 52 hours, using Incucyte Zoom instrument.

(B-C): UNC5B-induced cell death is associated with DNA fragmentation and caspase-3 activation and is inhibited by netrin-1. Stable HCT116 cells, transfected with luciferase (Luc) or UNC5B inducible plasmid, alone or constitutively expressing netrin-1 (UNC5B+NTN1), were treated with the indicated concentration of doxycycline (Dox) for 18 hours and apoptosis was evaluated by DNA fragmentation assay through flow cytometry (B) and by caspase-3 activity (C), quantified by fluorometric detection kit.

(D): Schematic representation of the CRISPR-Cas9 screening strategy. Stable HCT116 cells inducible for UNC5B (HCT116 UNC5B) were transduced with a small guide RNAs (sgRNAs) library. Upon puromycin selection, induction of apoptosis by receptor over-expression allowed the selection of resistant clones, knocked-out of the genes required for UNC5B apoptosis induction. Upon amplification of sgRNAs by PCR, candidate genes were identified by Next Generation Sequencing (NGS).

(E): Schematic proceedings for the bioinformatic analysis allowing selection of candidate genes.

(F): Gene ontology analysis of the screening results. Analysis was performed using DAVID Bioinformatics Resources 6.8 (Huang et al., 2007b).

Data are representative of at least three replicates as mean \pm SEM. ns, non-significant; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; NTN1, netrin-1; Dox, doxycycline; sgRNA, small guide RNA.

See also Figure S1.

Figure 2. COMMD2 is required for UNC5B-induced cell death and tumor suppression

(A): Silencing COMMD2 inhibits UNC5B-induced DNA fragmentation. Stable HeLa cells inducible for UNC5B were transfected with two distinct siRNA scramble (siCTRL) or targeting COMMD2 (siCOMMD2-1 and -2). Upon treatment for 18 hours with the indicated concentrations of doxycycline (Dox), DNA fragmentation was evaluated through FACS analysis. A representative experiment is showed in the left. The percentage of cells with fragmented DNA (Sub-G1) is indicated.

(B): COMMD2 knock-down suppresses cell death triggered by UNC5B. Stable HeLa-UNC5B cells were transfected with the indicated siRNA in 48-wells plate and treated 24 hours later with 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of doxycycline up to 48 hours. Cell death was monitored in real-time by means of propidium iodide (PI) staining through the Incucyte Zoom instrument.

(C): UNC5B-mediated caspase-3 activation requires COMMD2. Stable HeLa cells, transfected with scramble or COMMD2-targeting siRNA, were treated with doxycycline for 18 hours. Caspase-3 activity was evaluated by fluorometric detection kit. Caspase-3 activity was normalized to total protein amount and indexed to not-treated scramble-transfected cells.

(D,E): Tumor growth inhibition driven by netrin-1 interference necessitates UNC5B and COMMD2. NMRI *nude* mice were engrafted with stable H322 cells, knock-down for luciferase (sgCTRL, used as a non-targeting control), UNC5B (sgUNC5B) or COMMD2 (sgCOMMD2), generated with CRISPR-Cas-9-KRAB strategy. After tumor volume reached 50 mm³, mice were intraperitoneal treated three time per week with anti-netrin-1 (NP137) or control (NP001) antibodies. Tumor sizes were measured at the indicated days post-treatment (D). Tumor growth inhibition, allowing quantification of anti-tumor activity of NP137 antibody, was then calculated for each engrafted stable cell lines (E).

(F). Silencing UNC5B and COMMD2 restrains *in vivo* NP137-induced apoptosis. After sacrificing the mice, tumors were resected and apoptosis was quantified by immunostaining of active cleaved caspase-3. Positive cells were then indexed on tumors resected in NP001-treated mice for each stable cell line (Eleftheriou et al.). A representative quantification is showed (right).

Data are representative of at least three replicates as mean \pm SEM. ns, non-significant; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; Dox, doxycycline; sgRNA, small guide RNA.

See also Figures S2 and S3.

Figure 3. UNC5B-induced cell death requires the formation of a COMMD2-regulated ubiquitin-ligase complex

(A,B,C): Apoptosis induction by UNC5B involves CRL3 complex. Stable HeLa cells inducible for UNC5B (HeLa UNC5B) were transfected with siRNAs scramble (siCTRL) or targeting RBX1 (siRBX1-1 and -2) or Cullin-3 (siCUL3-1 and -2). 24 hours after transfection, cells were treated with the indicated doses of doxycycline (Dox) for 18 hours and DNA fragmentation (A) and caspase-3 activity (B) were assessed. A representative

experiment of DNA fragmentation is displayed in the right part of panel A. Percentage of cells showing fragmented DNA (Sub-G1) are presented in the inset. Induction of cell death in transfected cells was also evaluated in real-time, using propidium iodide (PI) staining through the Incucyte Zoom instrument (C). The variation of PI-positive cells upon treatment is indicated on cells transfected with siRNA targeting Cullin-3 (Eleftheriou et al.) and RBX1 (right). Silencing of Cullin-3 or RBX1 was adequate to restrain apoptosis induction upon UNC5B over-expression.

(D): NEDD8 inhibition protects cells from UNC5B-induced apoptosis. HeLa UNC5B cells were treated with the indicated concentrations of doxycycline and the NEDD8 inhibitor pevonedistat. 18 hours after treatment, apoptosis rate was measured by DNA fragmentation through flow cytometry. NEDD8 inhibition suppressed UNC5B-triggered apoptosis.

(E): Silencing the E2 ubiquitin-conjugating enzyme UBE2L6 inhibits apoptosis triggered by UNC5B. HeLa UNC5B cells were transfected with scramble (siCTRL), UBE2H- (siUBE2H-1 and -2) or UBE2L6-specific (siUBE2L6-1 and -2) siRNA. 24 hours after, cells were treated with 2 µg/mL of doxycycline and apoptosis was evaluated by DNA fragmentation. Knock-down of UBE2L6, but not UBE2H, inhibited UNC5B-induced apoptosis in HeLa UNC5B cells.

Data are representative of at least three replicates as mean ± SEM. ns, non-significant;

*p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001; ****p < 0.0001; Dox, doxycycline.

See also Figures S4.

Figure 4. UNC5B triggers proteasomal degradation of Mcl-1

(A,B): UNC5B-induced apoptosis requires proteasome activity. Stable HeLa cells inducible for UNC5B (HeLa UNC5B) were treated with doxycycline (Dox) at 2 µg/mL, in combination with the indicated doses of the proteasome inhibitors MG132 and bortezomib (BTZ) and the pan-caspase inhibitor Q-VD-OPh hydrate (QVD). 18 hours after treatment, apoptosis was measured by DNA fragmentation (A) and caspase-3 activity (B). Treatment with all the inhibitors was sufficient to strongly reduce apoptosis induction upon UNC5B over-expression.

(C): UNC5B triggers Mcl-1 degradation. HeLa UNC5B cells were treated with 2 µg/mL of doxycycline, in combination with bortezomib (BTZ, 1 µM) and Q-VD-OPh (QVD, 10 µM) inhibitors. 16 hours after treatment, cells were lysed by scraping and sonication in SDS-containing buffer. Protein levels of Mcl-1, Bcl-2 and Bcl-XL, as well as of UNC5B and actin, used as housekeeping gene, were evaluated by western blot. Ratio of protein levels between not-treated (0) and doxycycline-treated (2), normalized to actin, is showed in the bottom of each western blot. UNC5B over-expression specifically promoted Mcl-1 protein decrease. Proteasome inhibition, via treatment with bortezomib, rescued this degradation, while caspase inhibition through Q-VD-OPh, even though inhibited cell death, did not affect Mcl-1 degradation.

(D): UNC5B over-expression do not affect transcriptional regulation of Mcl-1. HeLa UNC5B cells were treated with 2 µg/mL of doxycycline for 24 hours. Mcl-1, Bcl-2 and Bcl-XL gene expression was analyzed by quantitative RT-PCR. Expression of TATA binding protein (TBP) and β-glucuronidase (GUSB) genes were used as housekeeping genes.

(E): Mcl-1 degradation induced by UNC5B requires COMMD2/CRL3 complex. HeLa UNC5B cells were transfected with scramble (siCTRL), COMMD2 (siCOMMD2) and RBX1 (siRBX1) siRNA. 24 hours after transfection, cells were treated with 2 µg/mL of

doxycycline for further 18 hours. Protein levels of Mcl-1, UNC5B and Ku80, used as housekeeping protein, were evaluated by western blot. Silencing COMMD2 or RBX1 was sufficient to block Mcl-1 degradation elicited by UNC5B over-expression.

Data are representative of at least three replicates as mean \pm SEM. **p < 0.01; ***p < 0.001; Dox, doxycycline; NT, not treated; BTZ, bortezomib; QVD, Q-VD-OPh.

Figure 5. UNC5B-mediated Mcl-1 degradation induces MOMP and caspase-9 activation

(A,B,C): Apoptotic cell death induced by UNC5B over-expression necessitates caspase-9. HeLa UNC5B cells were transfected with scramble (siCTRL) or caspase-9 (siCASP9B) siRNAs and 24 hours later treated with the indicated concentrations of doxycycline (Dox). PI-positive cells quantification was analyzed in real-time up to 48 hours using Incucyte Zoom instrument (A). DNA fragmentation was assessed by FACS analysis (B) and caspase-3 was measured using caspase-3 fluorometric kit (C), both 18 hours after treatment. Inhibition of caspase-9 gene expression decreased cell death triggered by UNC5B upon doxycycline treatment.

(D): UNC5B over-expression activates caspase-9, but not caspase-8. HeLa UNC5B cells were treated with 2 μ g/mL of doxycycline and 18 hours later both caspase-9 and -8 activities were evaluated by fluorometric kit, using specific substrates. UNC5B triggered a strong induction of caspase-9 activity, whereas caspase-8 activity did not increase upon doxycycline treatment.

(E): UNC5B-induced caspase-9 activity requires COMMD2/CRL3 complex. HeLa UNC5B cells were transfected with scramble siRNA (siCTRL), or siRNAs targeting COMMD2 (siCOMMD2-1 and -2), Cullin-3 (siCUL3-1 and -2), RBX1 (siRBX1-1 and -2) or caspase-

9 (siCASP9-1 and -2). 24 hours later, cells were treated with 2 µg/mL of doxycycline and caspase-9 measured by fluorometric kit. Silencing of at least one member of COMMD2/CRL3 complex was adequate to suppress caspase-9 activity induced by UNC5B.

(F): Proteasome or NEDD8 inhibition restrains caspase-9 activity triggered by UNC5B. HeLa UNC5B cells were treated with 2 µg/mL of doxycycline and with the proteasome inhibitors MG132 and bortezomib (BTZ), the NEDD8 inhibitor pevonedistat or the pan-caspase inhibitor Q-VD-OPh (QVD), at the indicated concentrations. 18 hours after treatment, caspase-9 activity was evaluated by fluorometric kit.

(G): UNC5B over-expression triggers Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization (MOMP) in a COMMD2/CRL3 complex-dependent manner. HeLa cells were transfected with scramble (siCTRL), COMMD2 (siCOMMD2-1), RBX1 (siRBX1-1) or caspase-9 (siCASP9-2) siRNAs. 24 hours after transfection, cells were treated with 2 µg/mL of doxycycline and after further 18 hours mitochondrial depolarization rate was quantified by JC-1 dye staining, using NucleoCounter NC3000. A representative experiment is showed in the right panel. Low right quadrant represents mitochondrial depolarized cells. Number in the quadrants correspond to percentage of cells. UNC5B induction strongly increased the percentage of polarized population in siCTRL-transfected cells, however silencing of COMMD2 or RBX1 suppress MOMP induced by UNC5B. Moreover, Interference with caspase-9 gene expression did not affect mitochondrial depolarization observed upon doxycycline treatment.

(H): Suppression of COMMD2/CRL3 complex or caspase-9 gene expression rescues UNC5B-induced apoptosis. HeLa UNC5B cells were transfected and treated as in (G) and DNA fragmentation was assessed by flow cytometry.

(I): Caspase-9 is not required for UNC5B-dependent Mcl-1 degradation. HeLa UNC5B cells were transfected with scramble (siCTRL) or caspase-9 (siCASP9-2) siRNAs. Cells were then treated with doxycycline and Mcl-1 protein was evaluated by western blot. Silencing caspase-9 was not sufficient to revert Mcl-1 degradation observed upon UNC5B induction.

(J): UNC5B-induced apoptosis involves the pro-apoptotic proteins BAX and BAK1. HeLa UNC5B cells were transfected with scramble (siCTRL), BAK1 (siBAK1-1 and -2) or BAX (siBAX-1 and -2) siRNAs. 24 hours later, cells were treated with doxycycline and after further 18 hours DNA fragmentation was evaluated by flow cytometry.

(K): UNC5B-induced Mcl-1 degradation does not require BAX and BAK1. HeLa UNC5B cells were transfected and treated as in (J). Mcl-1 protein levels were assessed by western blot.

Data are representative of at least three replicates as mean \pm SEM. ns, non-significant; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; Dox, doxycycline; NT, not treated; BTZ, bortezomib; QVD, Q-VD-OPh; JC-1, 5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide.

See also Figures S5.

Figure 6. Working model for UNC5B-mediated Mcl-1 degradation and activation of intrinsic apoptotic pathway

Induction of UNC5B is able to activate, via COMMD2, the Cullin-RING-ligase (CRL) complex 3 (CRL3). Through unknown mechanisms involving NEDDylation of CRL3 and activation of the E2 ubiquitin-conjugating enzyme UBE2L6, UNC5B promotes ubiquitination and proteasomal degradation of Mcl-1, allowing Mitochondrial Outer

Membrane Permeabilization (MOMP), release of cytochrome C, formation of apoptosome and finally activation of caspase-9, thus leading to apoptosis.

Supplementary Figure Legends:

Figure S1. CRISPR-Cas9 screening identifies genes and molecular pathways involved in UNC5B-induced cell death. Related to Figure 1.

(A): UNC5B induction upon treatment with doxycycline. Stable HCT116 cells, inducible for UNC5B, were treated with the indicated concentrations of doxycycline (Dox). 24 hours later, protein levels of UNC5B and GAPDH, used as housekeeping gene, were evaluated by western blot.

(B): Candidate genes identified upon CRISPR-Cas9-based screening. The number of guides showing an increase of reads compared to control condition is shown for each gene.

Figure S2. Characterization of stable HeLa cell line, inducible for UNC5B. Related to Figure 2.

(A): UNC5B induction upon treatment with doxycycline on HeLa UNC5B cells. Stable HeLa cells inducible for UNC5B (HeLa UNC5B) were treated with the indicated doses of doxycycline (Dox) for 18 hours. Protein levels of UNC5B and β -actin, used as housekeeping gene, were measured by western blot.

(B,C,D,E): UNC5B induction triggers apoptotic cell death in HeLa cells. HeLa UNC5B cells were treated with the indicated concentrations of doxycycline and netrin-1 (NTN1) conditioned medium or pan-caspase inhibitor Q-VC-Oph (QVD). DNA fragmentation was evaluated by flow cytometry (B), whereas caspase-3 activity was measured by fluorometric test (C) or in real-time up to 24 hours using Incucyte Zoom instrument (D). To evaluate cell death, propidium iodide (PI) incorporation was followed in real-time up to 48 hours by Incucyte Zoom technology (E).

Data are representative of at least three replicates as mean \pm SEM. ns, non-significant; *** $p < 0.001$; Dox, doxycycline; NTN1, netrin-1; QVD, Q-VD-Oph; PI, propidium iodide.

Figure S3. COMMD2 is required for UNC5B-induced cell death and tumor suppression. Related to Figure 2.

(A,B): COMMD2 silencing validation. HeLa UNC5B cells were transfected with scramble (siCTRL) or COMMD2 (siCOMMD2-1 and -2) siRNAs. 24 hours later, expression of COMMD2 was evaluated by quantitative RT-PCR (A) and western blot (B). For RT-PCR, TATA binding protein (TBP) and β -glucuronidase (GUSB) genes were used as housekeeping genes. For western blot analysis, β -actin was used as housekeeping protein.

(C): Validation of COMMD2 silencing in HCT116 cells. Stable HCT116 cells inducible for UNC5B (HCT116 UNC5B) were transfected with scramble (siCTRL) or COMMD2 (siCOMMD2-1) siRNAs and COMMD2 mRNA was measured by quantitative RT-PCR 24 hours after transfection.

(D): COMMD2 is required for UNC5B-induced apoptosis in HCT116 cells. HCT116 UNC5B cells were transfected as in (C) and DNA fragmentation was measured by flow cytometry 24 hours later. n=1

(E): COMMD1 do not rescue apoptosis induced by UNC5B. HeLa UNC5B cells were transfected with scramble (siCTRL) or COMMD1 (siCOMMD1-2) siRNAs. 24 hours after transfection cell death was determined by evaluating propidium iodide (PI) positive cells in real-time up to 26 hours, using Incucyte Zoom instrument.

(F): Validation of COMMD1 silencing in HeLa cells. HeLa UNC5B cells were transfected as in (E) and COMMD1 transcripts were quantified by quantitative PCR. TBP and GUSB genes were used as housekeeping genes.

(G): Validation of COMMD2 and UNC5B knock-out in H322 cells. Stable H322 cells, knock-down for luciferase (sgCTRL, used as a non-targeting control), UNC5B (sgUNC5B-A and -B) or COMMD2 (sgCOMMD2-A and -B), were generated with CRISPR-Cas-9-KRAB strategy. Protein levels of UNC5B and COMMD2 were assessed by western blot. β -actin was used as housekeeping protein.

(H): Validation of COMMD2 and UNC5B deletion in H322 cells engrafted in *nude* mice. Tumors obtained from nude mice engrafted with H322 cells non-transduced (Wild type) control (sgLuc) or knock-out for UNC5B (sgUNC5B) or COMMD2 (sgCOMMD2) were lysed and COMMD2 and UNC5B gene expression was evaluated by quantitative RT-PCR. n=3 for each stable cell line. TBP was used as housekeeping gene.

Data are representative of at least three replicates as mean \pm SEM. *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001; Dox, doxycycline; PI, propidium iodide.

Figure S4. UNC5B-induced cell death requires the formation of a COMMD2-regulated ubiquitin-ligase complex. Related to Figure 3.

(A): Validation of Cullin-3 and RBX1 silencing. HeLa UNC5B cells were transfected with scramble (siCTRL), RBX1 (siRBX1-1 and -2) or Cullin-3 (siCUL3-1 and -2) siRNAs. 24 hours after transfection, total RNA was extracted and RBX1 and Cullin-3 (CUL3) gene expression was assessed by quantitative RT-PCR. Relative gene expression was normalized to siCTRL condition, using TATA binding protein (TBP) and β -glucuronidase (GUSB) genes as housekeeping genes. n = 1.

(B): Cullin-2 is not involved in UNC5B-mediated cell death. HeLa UNC5B cells were transfected with scramble (siCTRL) or Cullin-2 (siCUL2-1) siRNAs. 24 hours later, cells were treated with doxycycline and cell death was assessed by measuring propidium iodide (PI) positive cells in real-time up to 42 hours, using Incucyte Zoom instrument.

(C): Validation of Cullin-2 silencing. HeLa UNC5B cells were transfected as in (B) and Cullin-2 (CUL2) gene expression was measured by quantitative RT-PCR as in (A).

(D): NEDD8 inhibition protects cells from UNC5B-induced caspase-3 activation. HeLa UNC5B cells were treated with the indicated concentrations of doxycycline and the NEDD8 inhibitor pevonedistat. 18 hours after treatment, caspase-3 activity was evaluated by fluorometric kit.

(E): Validation of UBE2H and UBE2L6 silencing. HeLa UNC5B cells were transfected with scramble (siCTRL), UBE2H (siUBE2H-1 and -2) or UBE2L6 (siUBE2L6-1 and -2) siRNAs. 24 hours after transfection, total RNA was extracted and UBE2H and UBE2L6 gene expression was assessed by quantitative RT-PCR, as described in (A).

Data are representative of at least three replicates as mean \pm SEM, except quantitative RT-PCR showed in (A). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; Dox, doxycycline; PI, propidium iodide; CUL3, Cullin-3; CUL2, Cullin-2; AUF, arbitrary unit of fluorescence.

Figure S5. UNC5B-mediated Mcl-1 degradation induces MOMP and caspase-9 activation. Related to Figure 4.

(A,B): Validation of caspase-9 and -8 silencing. HeLa UNC5B cells were transfected with scramble (siCTRL), caspase-9 (siCASP9-1 and -2) or caspase-8 (siCASP8-1 and -2) siRNAs. 24 hours after transfection, total RNA was extracted and caspase-8 (A) and -9 (B): gene expression was assessed by quantitative RT-PCR. Relative gene expression was normalized to siCTRL condition, using TATA binding protein (TBP) and β -glucuronidase (GUSB) genes as housekeeping genes.

(C): Caspase-8 is not required for UNC5B-induced cell death. HeLa UNC5B cells were transfected with scramble (siCTRL) or caspase-8 (siCASP8-2) siRNAs. 24 hours after transfection, cells were treated with doxycycline and cell death was assessed by measuring propidium iodide (PI) positive cells in real-time up to 48 hours, using Incucyte Zoom instrument.

(D): Validation of BAX and BAK1 silencing. HeLa UNC5B cells were transfected using scramble (siCTRL), BAX (siBAX-1 and -2) or BAK1 (siBAK1-1 and -2) siRNAs. Quantitative RT-PCR was performed as in (A).

Data are representative of at least three replicates as mean \pm SEM. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$

Methods:

Cell Lines, Transfection Procedures, Reagents

Human colon HCT116 and cervix HeLa cancer cell lines were cultured in DMEM medium (Life Technologies) containing 10% fetal bovine serum. HEK 293T cells were cultured in DMEM medium (Life Technologies) containing 10% fetal bovine serum, non-essential amino acids (MEM NEAA, Life Technologies) and 50 µg/ml Geneticin (Life Technologies). Human lung H322 cells were cultured in RPMI 1640 + Glutamax medium (Life Technologies) containing 10% fetal bovine serum. For RNA interference experiments, cell lines were transfected using lipofectamine RNAiMAX reagent (Life Technologies). For plasmid transfection, HCT116 cell line was transfected using lipofectamine Plus reagent (Life Technologies); HeLa cell line was transfected using jet prime (PolyPlus-Transfection). All transfections were performed according to the manufacturer's protocol. **BH3 mimetics ABT-199 and WEHI-539 were purchased from Selleckchem.** NEDD8 inhibitor pevonedistat was purchased from Selleckchem. Proteasome inhibitors MG132 and Bortezomib were purchased from Sigma-Aldrich. Caspase inhibitor QVD was purchased from Adooq Bioscience.

Generation of stable cell lines

For the generation of inducible stable cell lines, HIS-tagged rat UNC5B coding sequence was cloned at Sfil sites in the pSBtet-GH plasmid, a sleeping beauty-based vector allowing the doxycycline inducible expression of UNC5B, as well as the constitutive expression of rtTA protein, hygromycin resistance gene and green fluorescent protein (GFP), expressed under the control of the synthetic RPBSA promoter. HCT116, HeLa, **Sk-MEL-5 and T47D** cell lines were co-transfected with UNC5B-pSBtet-GH and a

sleeping beauty transposase expression vector (SB100X). Sleeping beauty transposase expression vector was a generous gift of Prof. Rolf Marschalek (Goethe-University of Frankfurt, Germany). pSBtet-GH was a gift from Eric Kowarz (Addgene plasmid # 60498; <http://n2t.net/addgene:60498>; RRID:Addgene_60498). Stable cell clones were selected for 7 days in hygromycin-containing medium. Then UNC5B stable cell lines were sorted by flow cytometry to selected GFP positive cells. All the stable inducible cell lines were further tested for UNC5B expression in response to doxycycline.

Stable cell line constitutively expressing netrin-1 were generated by lentiviral infection, using self-inactivating HIV-1-derived vector (pWPXLd), encoding netrin-1 under the control of Human Elongation Factor-1 alpha (EF-1 Alpha) promoter. For the generation of HCT116 stable cell line inducible for UNC5B used for the screening, a pCW57.1 vector was used, and stable cell line was generated by lentiviral infection. This lentiviral vector allows the doxycycline inducible expression of UNC5B and the constitutive expression of rtTA protein and hygromycin resistance gene. pWPXLd vectors was a generous gift of Carine Maise (INRA UMR754, Lyon, France). pCW57.1 was a gift from David Root (Addgene plasmid # 41393 ; <http://n2t.net/addgene:41393> ; RRID:Addgene_41393).

For the generation of stable H322 cell lines knocked-out for UNC5B or COMMD2, different small guide RNAs (sgRNA) were designed using the sgRNA designer tool (CRISPRko), available at <http://portals.broadinstitute.org/gpp/public/analysis-tools/sgrna-design> site. sgRNAs were designed close to UNC5B or COMMD2 promoters. BsmBI linker were added to sgRNAs and the oligonucleotides were then annealed by incubation for 3min at 90°C and 15min at 37°C and inserted in BsmBI-digested pLV hU6-sgRNA hUbC-dCas9-KRAB-T2a-Puro vector (Thakore et al., 2015), allowing expression of defective

Cas9 enzyme (dCas9) fused to the Krüppel-associated box (KRAB) transcriptional repressor (dCas9-KRAB). pLV hU6-sgRNA hUbC-dCas9-KRAB-T2a-Puro was a gift from Charles Gersbach (Addgene, plasmid #71236; <http://n2t.net/addgene:71236>; RRID:Addgene_71236).

Quantitative RT-PCR

Total RNAs were extracted using NucleoSpin® RNA Plus Kit (Macherey Nagel, Düren, Germany) according to manufacturer's protocol. RT-PCR reactions were performed with PrimeScript RT Reagent Kit (Takara Bio Europe, Saint-Germain-en-Laye, France). 500 ng total RNA was reverse-transcribed using the following program: 37°C for 15min and 85°C for 5sec. For expression studies, the target transcripts were amplified in LightCycler®2.0 apparatus (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA), using the Premix Ex Taq probe qPCR Kit (Takara Bio Europe), according to manufacturer instructions. Expression of target genes was normalized to TATA binding protein (TBP) and beta-glucuronidase (GUSB) genes, used as housekeeping genes. The amount of target transcripts, normalized to the housekeeping gene, was calculated using the comparative CT method. A validation experiment was performed, in order to demonstrate that efficiencies of target and housekeeping genes were approximately equal. Sequences of the primers are available upon request.

Western Blotting Analysis

For immunoblotting analysis, cells were lysed by sonication in SDS buffer (10mM Tris-HCl pH 7.4, 10% glycerol, 5% SDS, 1% TX-100, 100 mM DTT) in the presence of protease inhibitor cocktail (Roche Applied Science). Protein extracts (20-50 µg per lane) were loaded onto 4-15% SDS-polyacrylamide gels (Biorad, Hercules, CA, USA) and

blotted onto nitrocellulose sheets using Trans-Blot Turbo Transfer System (Biorad). Nitrocellulose sheets were blocked with 10% non-fat dried milk in PBS/0.1% Tween 20 (PBS-T) for 1 hour and then incubated over-night at 4°C with the following antibody: rabbit monoclonal antibody α -UNC5B (1:1000, clone D9M7Z, # 13851, Cell Signaling); mouse monoclonal antibody α - β -actin, HRP-conjugated (1:10000, clone BA3R, #MA5-15739-HRP, Life Technologies); rabbit monoclonal antibody α -Mcl-1 (1:1000, clone D5V5L, #39224, Cell Signaling); rabbit monoclonal antibody α -Bcl-XL (1:1000, clone 54H6, # 2764, Cell Signaling); rabbit polyclonal antibody α -Bcl-2 (1:1000, clone 21, # 783, Santa Cruz); rabbit polyclonal antibody α -COMMD2 (1:1000, HPA044190, Sigma-Aldrich). After three washes with PBS-T, membranes were incubated with the appropriate HRP-conjugated secondary antibody (1:10000, Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK) for 1h. Detection was performed using West Dura Chemiluminescence System (Life Technologies). Membranes were imaged on the ChemiDoc Touch Imaging System (Biorad).

Cell Death Assays

For propidium iodide (PI) staining, stable inducible cell lines were seeded in 48-well-plates at density of 25×10^3 cells/well. The following day, cells were treated with doxycycline and 0.33 mg/ml PI in serum-free (HCT116) or 10% serum medium (HeLa) and the plates were transferred into Incucyte Zoom instrument (Essen Bioscience). Images of living cells and PI-stained dead cells were taken every two or three hours and PI-stained cell numbers were calculated.

For DNA fragmentation analysis (SubG1), HCT116 and HeLa cell lines were plated onto 6-well-plates at a density of 2×10^5 cells per well. The following day, cells were

transfected with siRNA, as described above, and incubated in serum-free medium for 24 hours. 24 hours later, transfected cells were treated with doxycycline in 10% serum medium and further incubated for 18 hours. Then cells were collected, fixed in 70% ethanol and incubated at -20°C for at least one night. Further, cells were washed twice with PBS and incubated for 15 min at room temperature in PBS containing 2 mg/ml RNase A and 40 mg/ml PI. DNA content was evaluated by fluorescence activated cell sorting (FACS) analysis on a FACScalibur or FACS Cantoll (BD Bioscience).

Caspase-3 and -9 activity assays were performed as described previously (Paradisi et al., 2013; Paradisi et al., 2009). Briefly, HCT116 and HeLa cells were seeded and treated as for DNA fragmentation assay. Cells were then collected and caspase-3/caspase 9 activity assays were performed using the Caspase-3/Caspase-9 Fluorometric Assay Kit (BioVision, Milpitas, CA, USA), according to the manufacturer's instructions. Caspase activity (activity / min / mg of protein) was calculated from a 1h kinetic cycle reading on a spectrofluorometer (405nm / 510nm, Infinite F500, Tecan, Männedorf, Switzerland).

Mitochondrial potential assay

HCT116 and HeLa cells were seeded and treated as for DNA fragmentation assay. Cells were then collected and washed with PBS. 1×10^6 cells for each sample were suspended in 1 mL PBS containing JC-1 dye (2.5 µg/mL, Chemometec). After incubation at 37 °C for 15 minutes, stained cells were centrifuged at 800 x g for 5 min at room temperature and supernatant was removed completely without disturbing the cell pellet. Afterwards, cell pellet was resuspended in 1 ml PBS for washing, then centrifuged at 800 x g for 5 min at room temperature and supernatant was removed again. Washing step

was repeated twice. Later, cell pellet was resuspended by pipetting in 250 μ l PBS buffer containing 1 μ g/ml DAPI. The final stained cells were analyzed by using NucleoCounter NC-3000 (Chemometec).

Conditional medium production

HCT116 stable cells constitutively expressing netrin-1 were plated in 100mm-dishes (3×10^6 cells/dish). 24h later, cell media was collected and centrifuged at 1200 x g for 5 minutes and supernatant was recovered as netrin-1 conditional medium.

CRISPR-Cas9 Screening

Gecko library

Human GeCKOv2 CRISPR knockout pooled library (targeting 19.050 genes and divided two half-libraries, each containing 3 sgRNAs against each gene) was a gift from Feng Zhang (Addgene #1000000048, #1000000049).

DNA amplification of the library

Each lentiviral library (A and B) was amplified and prepared separately following the same protocol. 2 μ L of 50 ng/ μ L of each GeCKO library were electroporated in Endura electrocompetent cells (Lucigen). Electroporation in competent cells was made 4 times for each library. Cells were recovered in recovery media and placed in shaking incubator for 1 hour at 37°C. For each library, electroporated cells were plated on two pre-warmed 600 cm² LB agar plates with ampicillin and were grown for 16 hours at 37°C. In parallel, a 30.000-fold dilution of the full transformation was plated to estimate transformation efficiency and ensure that full library representation is preserved. The total number of colonies was at least $3 \cdot 10^6$ corresponding approximately to 50 colonies per construct in each GeCKO library. Colonies were harvested by adding 10 mL of LB medium onto each

plate and scrapped with a cell spreader. Liquid plus scrapped colonies were collected into a tube and the procedure was repeated a second time on the same plate with additional 10 mL of media. Appropriated number of MaxiPrep (NucleoBond Xtra, Macherey Nagel) were performed and the concentration of each library was determined by UV-VIS spectroscopy (NanoDrop 2000, Thermo Fischer Scientific). Plasmid libraries A and B were pooled in equimolar proportions for lentivirus production.

Lentivirus production and titration

HEK 293T cells were seeded at $5 \cdot 10^6$ cells per 150mm-dish one day prior to transfection. Cells were transfected using Xtreme gene reagent (Roche) with three expression vectors, respectively, 10 μ g of phCMV-VSV-g, 15 μ g phCMV-Gag-Pol- HIV, 20 μ g GeCKO plasmid library. Six hours after transfection, medium was replaced. Two viral harvests were collected at 40 hours and 60 hours after transfection. The two harvests were pooled, centrifuged and filtered through a 0.45 μ m filter. Aliquots from the cleared supernatant were stocked at -80°C . Lentivirus production was titrated by infecting HCT116 cells in 12-well plates with several different volumes of lentivirus. The day after infection, each well was split into two wells: one receiving puromycin at 0.8 μ g/mL, the other one no puromycin. 72h after selection, cells were counted to calculate the percent of transduction and determine the viral titer.

Cell library generation

The day before transduction, HCT116 cells were plated in eight 12-well plates at a concentration of 10^5 cells per well. Cells were then transduced with a volume of GeCKO lentivirus library determined earlier for achieving an MOI between 0.3 and 0.5. HCT116 cells were transduced by spininfection during 1h30 at 37°C in complete DMEM medium

supplemented with 8 µg polybrene. The following day, cells were trypsinized, seeded into eight 150mm-dishes and treated with puromycin at 0.8 µg/mL. As a control of selection, non-transduced cells were plated and treated with puromycin at 0.8 µg/mL.

UNC5B challenge in library-transduced cells

After puromycin selection, a part of the cell library was lysed for genomic extraction and sequencing. Two conditions of 24.106 cells each were plated in 0% serum DMEM, and treated or not with 2 µg/ml of doxycycline. In parallel, a control condition of stable HCT116 cell line, inducible for UNC5B and not transduced with CRISPR library, was induced with the same doxycycline concentration. When all cells were dead in the control condition, surviving cells of the two conditions of the library were amplified for three days and then lysed for genomic extraction and sequencing.

Genomic extraction and DNA amplification

Genomic DNA (gDNA) was extracted from the cell library before UNC5B induction and from surviving cells after UNC5B induction using NucleoSpin Tissue Kit (Macherey-Nagel). The amplification of pooled sgRNA isolated from cell samples was carried out using Clone Amp HiFi enzyme (Takara Bio Europe). Primers were designed in order to amplify a 150b bp region surrounding sgRNA sequences and add a barcode sequence, specific for each sample, and an adapter needed to immobilize PCR product in the NGS flow cells. Three separate PCRs with 250 ng of gDNA each were realized for each sample. PCR products were purified with PCR Clean-up/Gel extraction kit (Macherey Nagel) then run on agarose gel following by a new purification step with the same kit. A last step of purification (AMPure, Beckman Coulter) was done prior sequencing.

Next Generation Sequencing and analysis

Next Generation Sequencing (NGS) was performed by the Sequencing platform at IGFL (Lyon) using Ion PI HiQ Chef Kit and Ion PI HiQ chip v3 (100pb-80M reads) on Ion Torrent platform (Thermo Fischer Scientific). The amplified samples were pooled together on the sequencing chip for the run and differentiated with barcode identification. Raw data from sequencing were processed to eliminate incorrect sequences and trim sequences flanking the sequence of the sgRNA. The trimmed sequences were blasted against the GeCKO library database with determined parameters (95% identity on 90 % of the length) and only the first hit was kept. Finally, a list was obtained with the number of reads for each sgRNA for each experimental condition. For a given condition, the number of reads of each sgRNA was normalized by the total number of reads in this condition. Reads were then normalized by subtracting the number of reads in UNC5B-induced condition to the control condition. Finally, sgRNA sequences with more than 100 normalized reads were selected, and then genes with more than 3 sgRNA sequences were selected and confirmed.

In vivo Xenograft Model

Five-week-old (20-22 g body weight) female *nude* mice were obtained from Janvier animal facility. The mice were housed in sterilized filter-topped cages and maintained in a pathogen-free animal facility. Stable H322 sgUNC5B, sgCOMMD2 or sgCTRL cell lines were implanted by subcutaneous injection of 5×10^6 cells in 100 μ L of growth factors reduced matrigel (Corning) diluted in 100 μ L of PBS into the right flank of the mice. Tumors were measured with a caliper and volume were calculated by the formula $V = 0.5 (\text{lengh} \times \text{width}^2)$. Randomization into groups was established when tumors reached $50 \pm 10 \text{ mm}^3$. Netrin-1 antibody (NP137) or an isotypic control (NP001) were injected intraperitoneally

into mice three times a week at 10 mg/kg. Tumor volume was monitored at the day indicated, allowing to calculate the percent of tumor growth inhibition (%TGI) calculated by the formula $TGI (\%) = (1 - T/C) \times 100$, where T indicates the mean tumor volume of test group (treated with netrin-1 antibody), and C indicates the mean volume of the isotype control-treated group. Protocol was stopped after the first tumor reached 500 mm³, mice were sacrificed and the efficiency of treatments on cell death induction was assessed by cleaved caspase-3 immunostaining in tumors extracted.

IHC analysis of xenografted cell lines and quantification

IHC analysis of xenografted cell lines and quantification IHC staining was performed on an automated Immunostainer (Ventana Discovery XT) using a DABmap kit and REDmap kit according to the manufacturer's instructions. Tissue samples were fixed in 10% buffered formalin and embedded in paraffin. After antigen unmasking [EDTA buffer (pH 8.4), 98°C for 35 minutes], apoptotic cell staining was performed using a rabbit cleaved caspase-3 antibody (clone 5A1E, 9664L, Cell Signaling Technology). The slides were scanned by an Axio-Scan Zeiss microscope. Image quantification was conducted using the software ImageJ.

Statistical analysis

The data reported are the mean \pm S.E.M. of at least three independent determinations, each performed in triplicate. Statistical analysis was performed by the student t test.

Figure 1

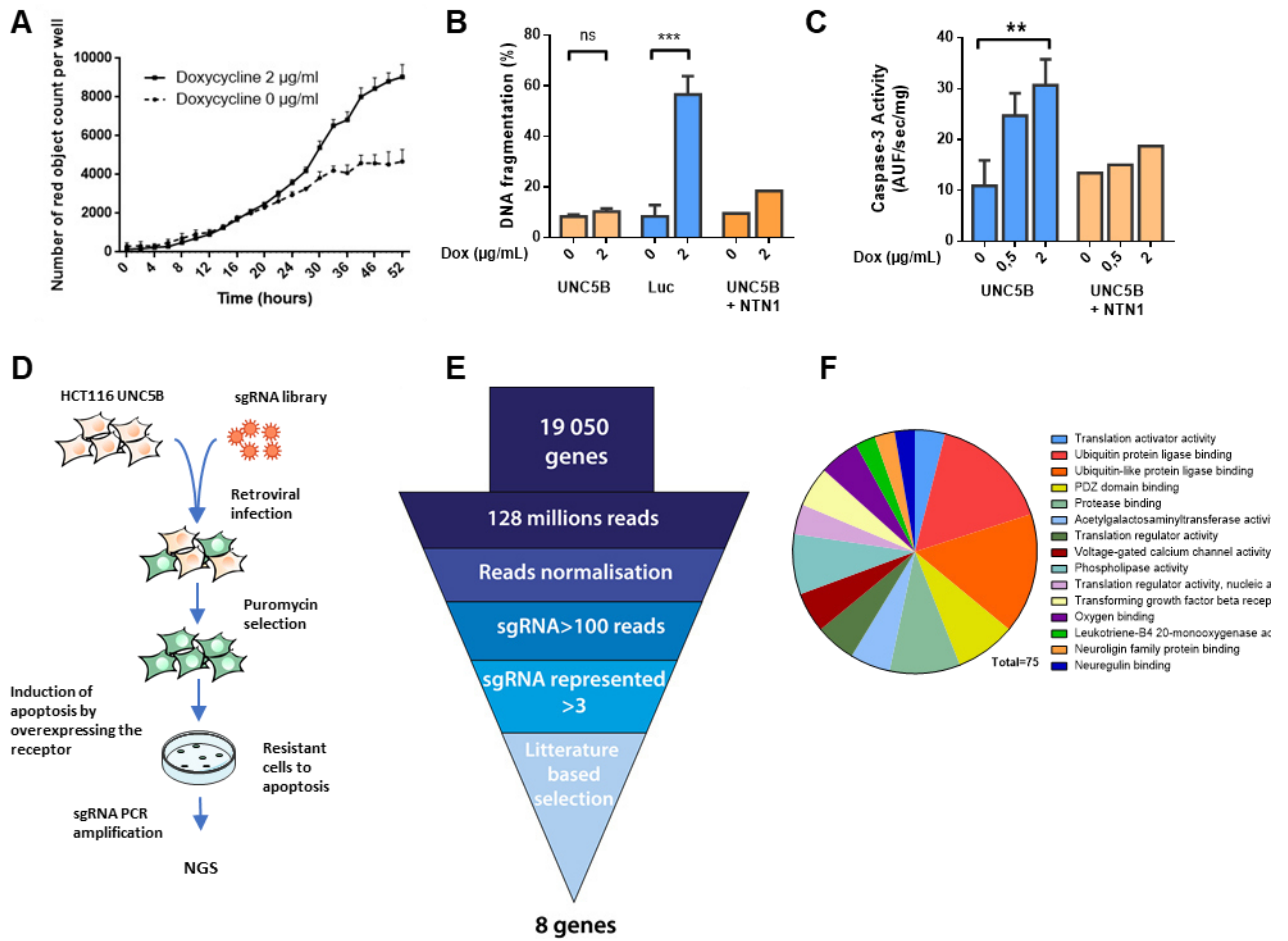


Figure 2

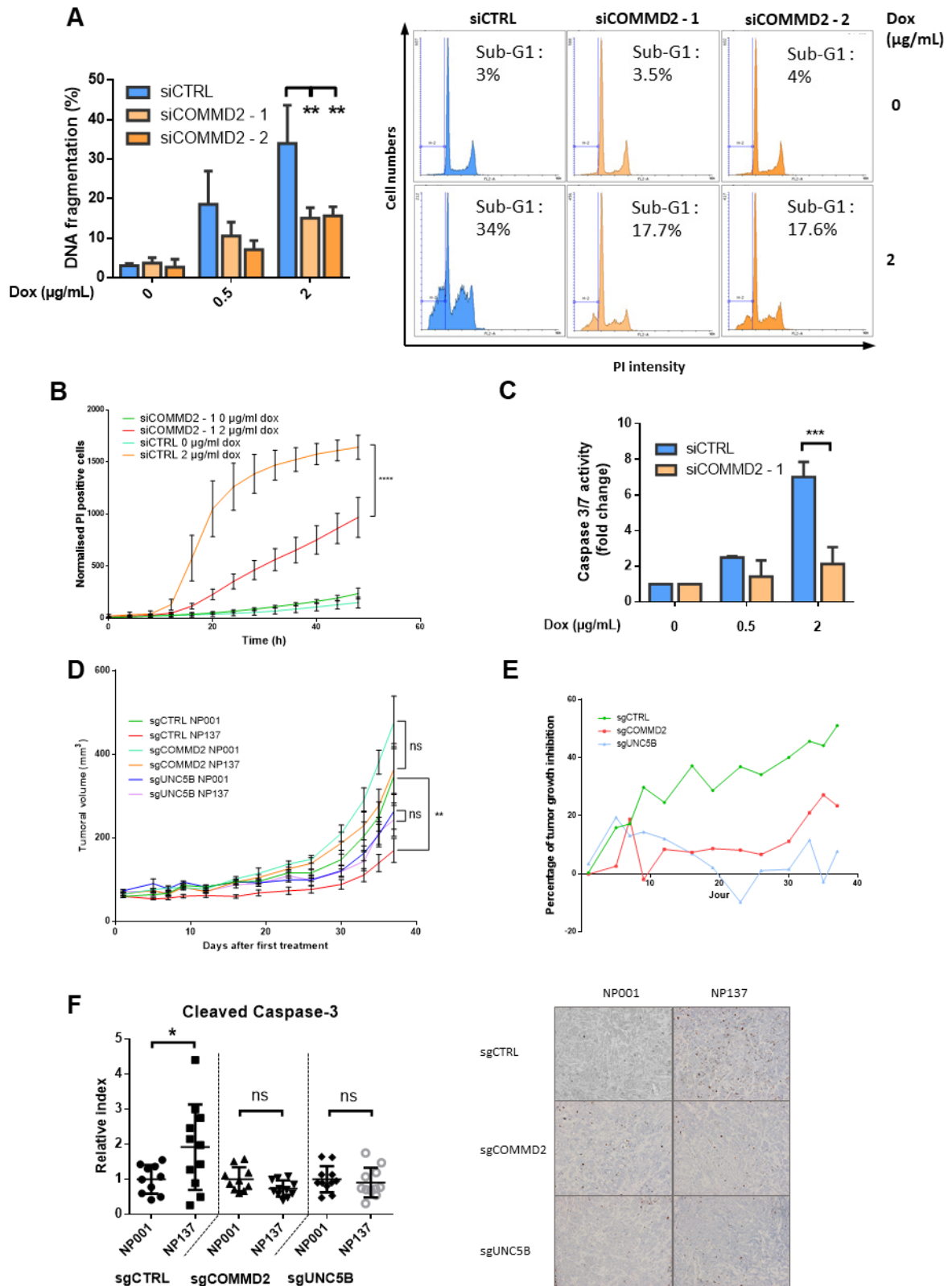


Figure 3

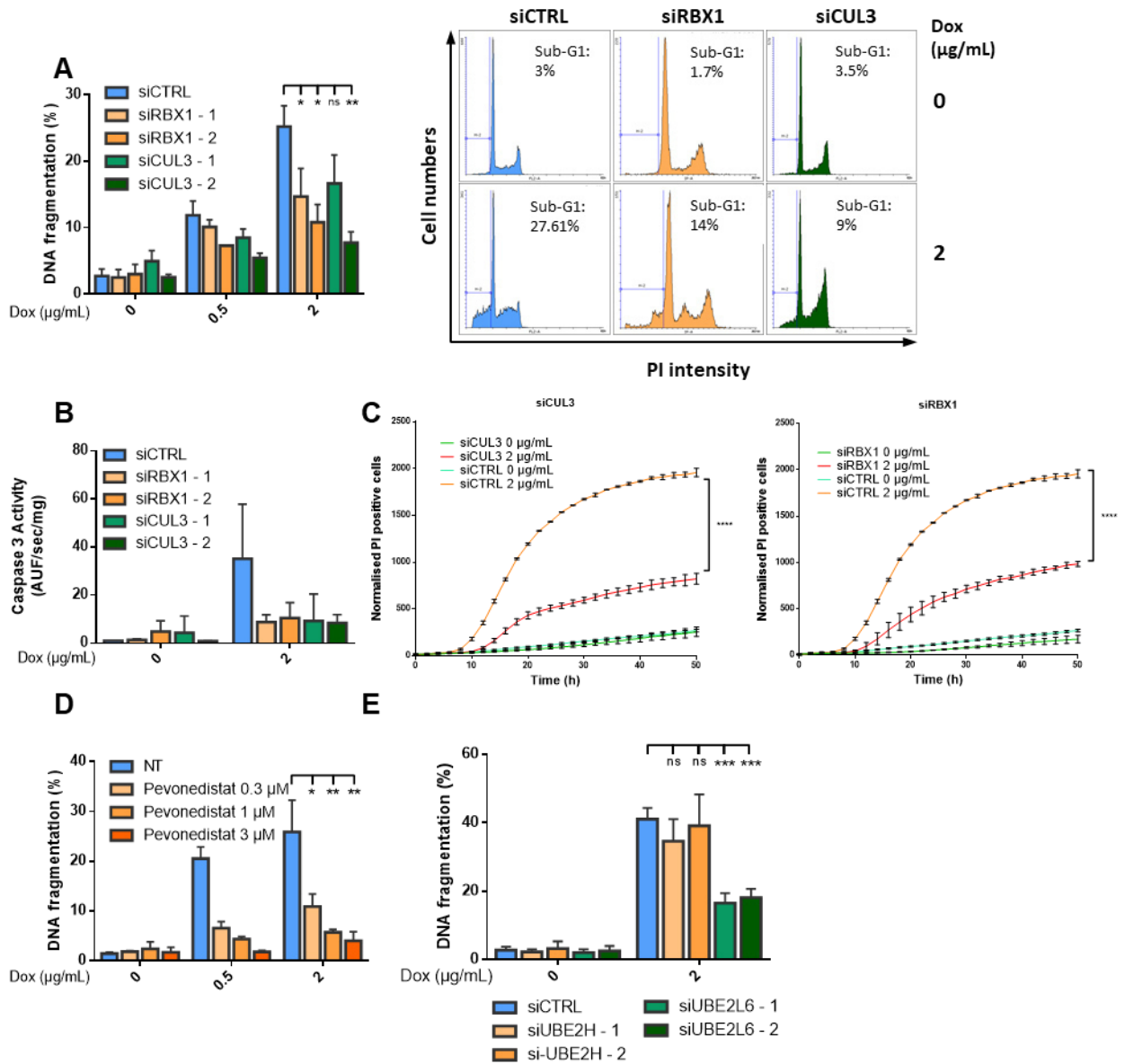


Figure 4

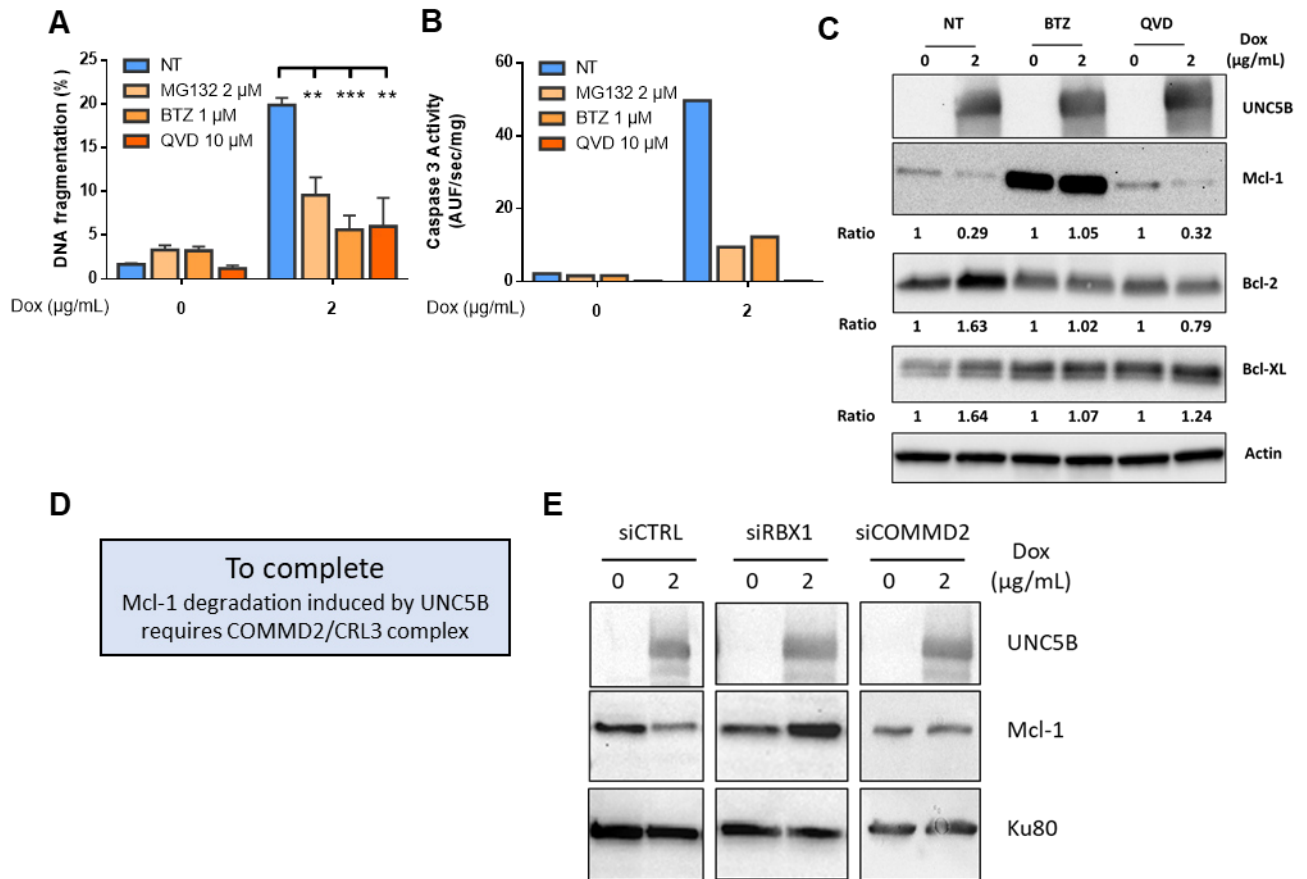


Figure 5

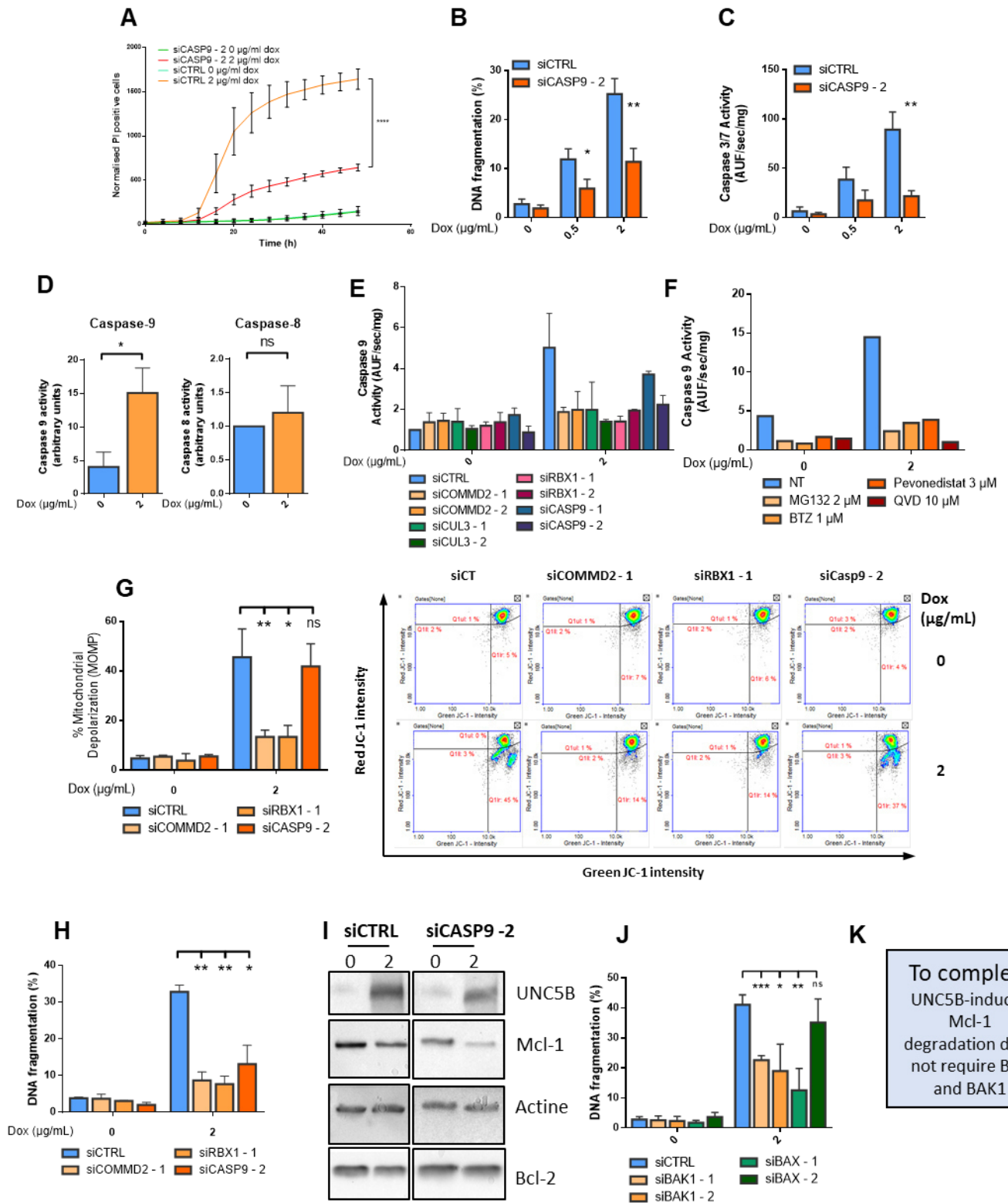
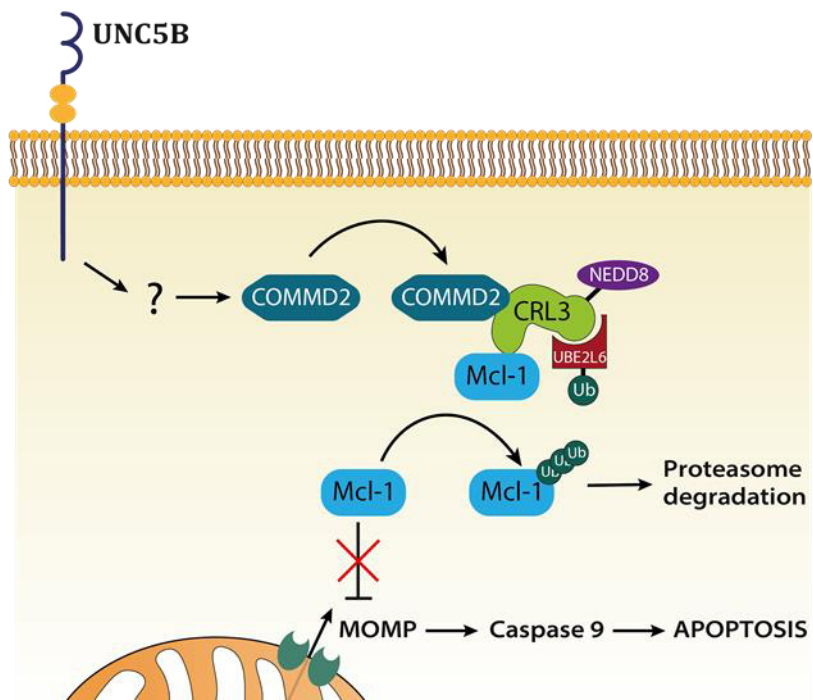
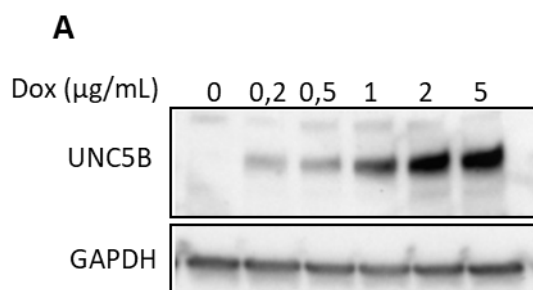


Figure 6



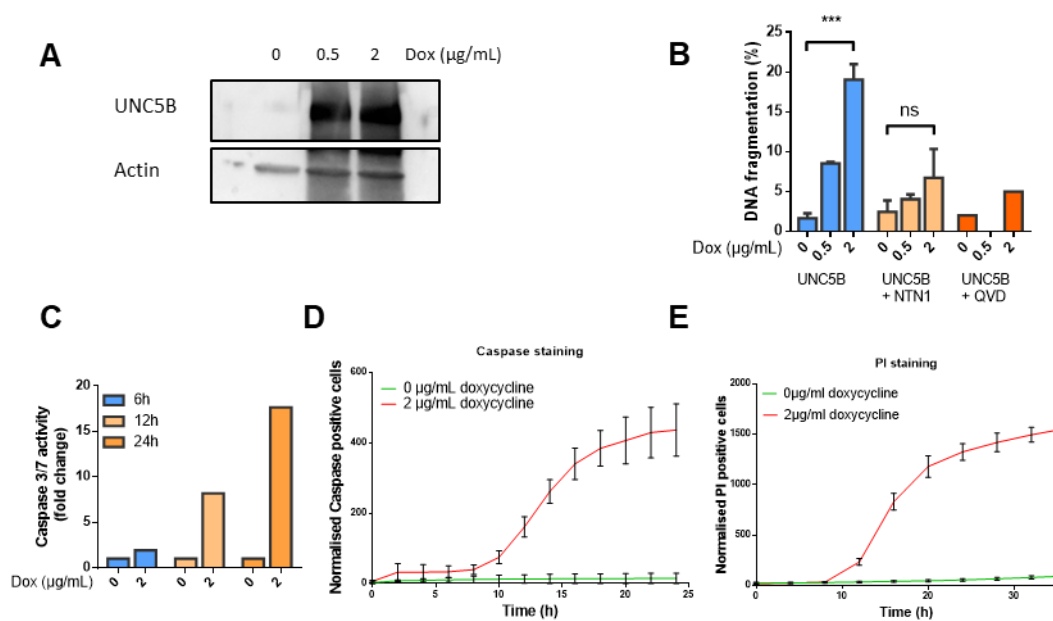
Supplementary figure 1



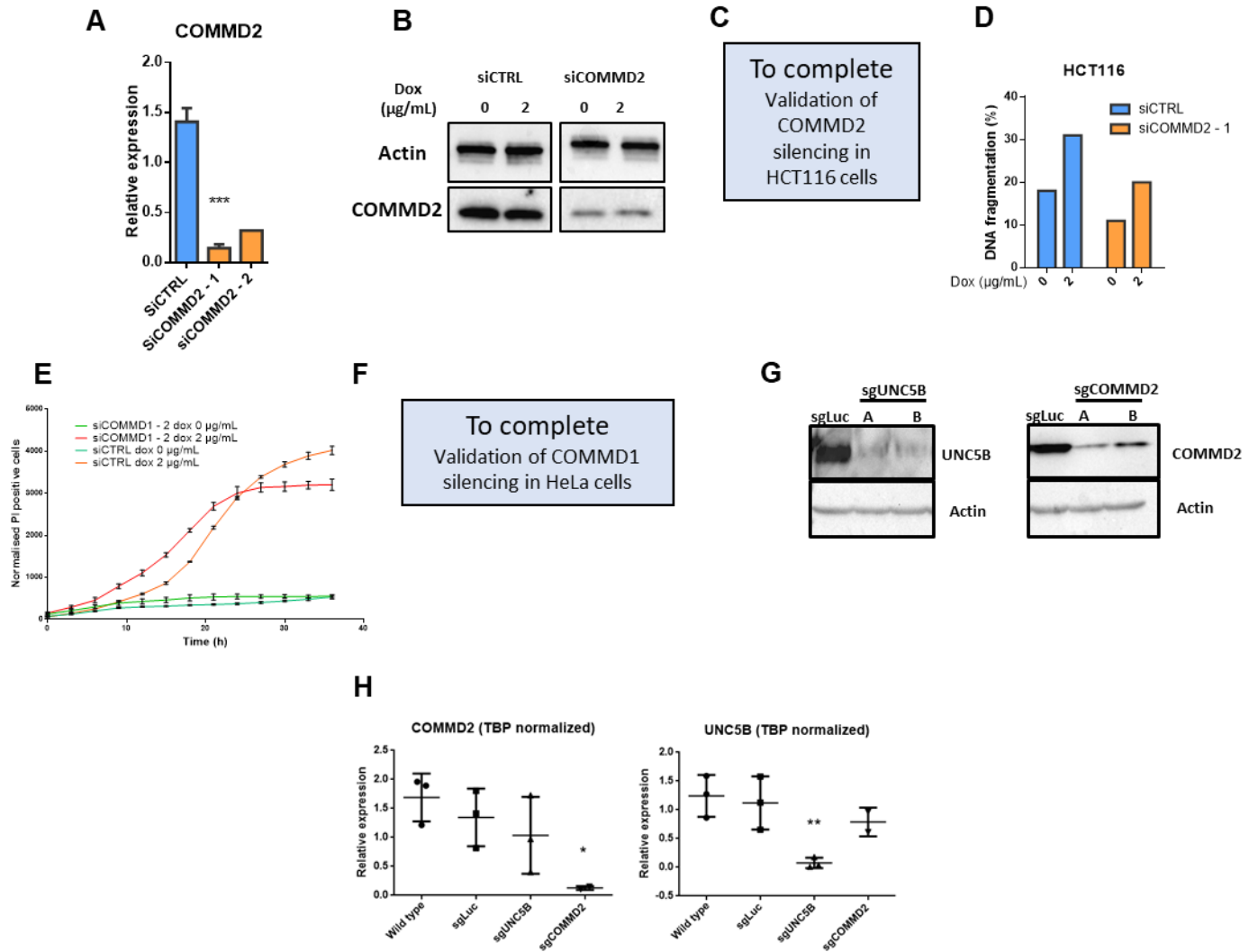
B

Gene	Numbers of guides
KEAP1	5
F2R	4
GADD45B	3
GRHL1	4
DCAF12L2	5
PARK2	6
THAP5	6
COMMD2	5

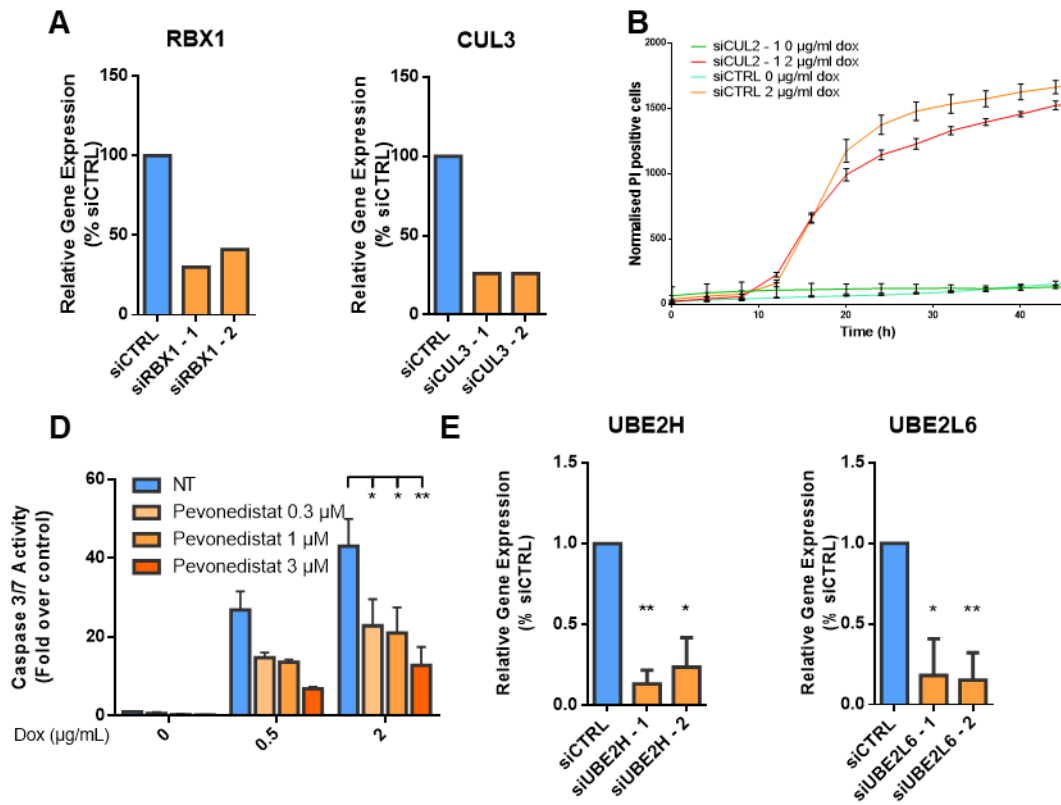
Supplementary figure 2



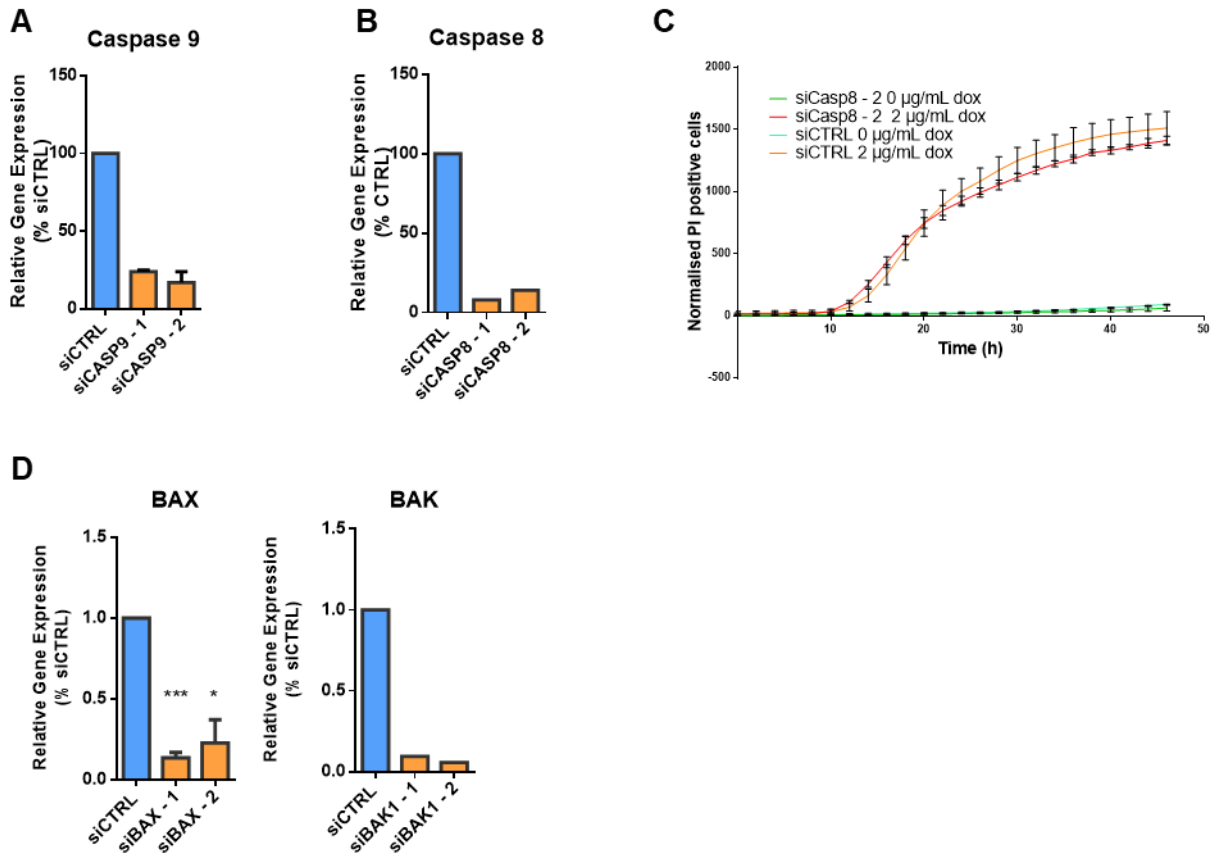
Supplementary figure 3



Supplementary figure 4



Supplementary figure 5



Discussion et perspectives

Les résultats obtenus au cours de ma thèse ont permis de préciser les mécanismes conduisant à la mort induite par UNC5B, et ainsi d'établir un schéma hypothétique de cette voie (**Figure 20**). En absence de nétrine-1, UNC5B provoque l'activation de COMMD2, par des mécanismes encore inconnus. Une fois activé, COMMD2 interagit avec le complexe CRL3 qui ubiquitine alors Mcl-1 et provoque sa dégradation par le protéasome. Cela aura pour conséquence de déséquilibrer la balance pro-apoptotique, menant à la perméabilisation mitochondriale et aux activations successives de la caspase 9 et de la caspase 3 et finalement à l'apoptose de la cellule.

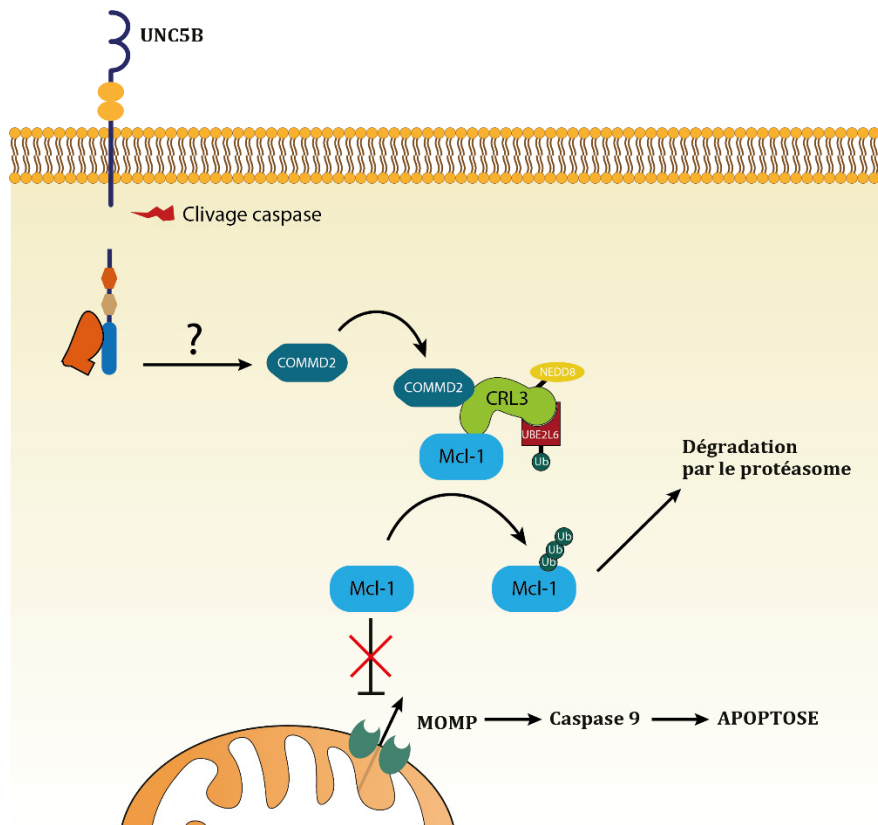


Figure 20 : Schéma hypothétique de la mort induite par UNC5B

Ces résultats mécanistiques amènent un regard nouveau sur l'apoptose induite par UNC5B, mais aussi sur les stratégies thérapeutiques utilisant cette voie de mort. En effet,

l'implication de Mcl-1 se révèle très intéressante car c'est une protéine clé de la voie de mort intrinsèque, déjà reconnue comme une cible thérapeutique de premier choix. Cela nous permet donc de discuter des applications possibles de cette découverte utilisant l'anticorps anti-netrine-1 développé dans notre laboratoire.

Dans cette discussion, nous reviendrons d'abord sur les problèmes rencontrés au cours de cette étude, ainsi que les limites de ces travaux. Nous aborderons ensuite un peu plus en détails les hypothèses et les interrogations que ces résultats amènent d'un point de vue mécanistique. Pour finir, nous placerons ces résultats dans une perspective thérapeutique, et discuterons des enjeux impliqués.

1. Difficultés et limites de l'étude

Le choix de réaliser un screening au début de ce projet de thèse, plutôt que de repartir des travaux mécanistiques déjà effectués auparavant, est un choix assumé. En effet, les dernières études portant sur les voies de signalisation médiées par UNC5B remontaient à 2010. L'ambition du projet était d'amener un œil neuf sur ces voies, en repartant sur de nouvelles bases. De plus, à la différence des travaux de 2010, nous avons la possibilité d'utiliser des lignées stables inductibles pour UNC5B, nous affranchissant des différents problèmes liés aux transfections transitoires, et nous permettant de réaliser un criblage CRISPR-Cas9.

Toutefois, cette approche a présenté plusieurs écueils. Tout d'abord, la mise en place d'un modèle cellulaire présentant une mort suffisamment importante pour être utilisé dans le screening s'est révélé plus longue que prévu. Plusieurs modèles sélectionnés se sont avérés résistants à l'induction du récepteur, et pour ceux répondant à la surexpression de UNC5B, seul une partie de la population cellulaire s'est révélée sensible. Cela représentait donc un problème majeur dans l'établissement d'un screening, car les cellules résistantes risquaient d'avoir un impact trop important sur le bruit de fond du aux « faux positifs » du screening. Nous avons donc dû trouver les conditions d'induction adéquates pour optimiser la mort induite par UNC5B, en nous plaçant notamment dans des conditions dépourvues de sérum. Nous avons en effet observé qu'en plaçant les cellules dans de telles conditions de stress, celles-ci étaient plus sensibles à l'induction d'UNC5B. Cette observation s'explique en grande

partie par les résultats obtenus par la suite (discuté plus loin en partie 2. Considérations mécanistiques).

Ensuite, les résultats du screening n'ont pas apporté de cibles « évidentes » impliquées dans des voies de morts déjà reconnues. Effectivement, nous aurions pu nous attendre à retrouver des partenaires clés en aval des voies pro-apoptotiques, telles que les caspases 8 ou 9, ou encore les protéines pro-apoptotiques BAX ou BAK. Cette absence de cibles connues s'explique par plusieurs inconvénients inhérents à ce type de screening. Tout d'abord, les séquences de sgARN constituant la librairie ont été mis au point *in silico*, sans validation individuelle des séquences, trop fastidieuse à l'échelle génomique. Il existe donc une probabilité que les séquences utilisées ne soient pas efficaces. Pour circonvenir à cette possibilité, 6 séquences guides par gène ont été utilisées pour le screening. De plus, même si la séquence est efficace, il existe une probabilité pour que la protéine ne soit pas invalidée par le système de réparation non homologue. La banque cellulaire est réalisée de façon à limiter cette probabilité en infectant suffisamment de cellules mais cette possibilité existe. Ensuite, si le gène ciblé est essentiel à la survie, ou même à la prolifération de la cellule, celui-ci ne sera pas représenté dans le screening. Par ailleurs, les cellules peuvent s'adapter à la perte constitutive du gène, pour continuer à assurer les fonctions cellulaires normalement assurées par la protéine ciblée. Enfin, dans certain cas, des mécanismes de redondance génétique peuvent maintenir la fonction cellulaire malgré l'invalidation du gène. Tous ces facteurs, combinés au bruit de fond positif diminuent la puissance du screening, et rendent plus difficile l'identification de partenaires potentiels. De plus, nous avons décidé d'imposer un filtre de 3 guides représentés dans le séquençage pour considérer une cible comme positive. Des gènes impliqués dans notre voie de mort, tels que BAX ou la caspase 9 étaient représentés dans le séquençage, mais sous cette valeur seuil.

Les résultats du screening ont donc donné lieu à une phase exploratoire portant sur des cibles peu connues. Nous nous sommes notamment intéressés à COMMD2, dont l'invalidation permet une réversion impressionnante de la mort induite par UNC5B, mais qui est une protéine qui n'est pratiquement pas décrite dans la littérature. En effet, aucune étude ne traite directement de COMMD2, et les informations dont nous disposons sur cette protéine provenait de l'étude des autres membres de la famille COMMD. Le membre le plus

décrit de la famille, COMMD1, apparait en revanche dans 159 papiers après recherche sur PubMed. Par analogie, nous avons donc exploré les différentes fonctions connues de COMMD1 pour déterminer si certaines d'entre elles étaient communes avec COMMD2. Nous avons donc expérimenté plusieurs pistes portant par exemple sur la régulation de NF- κ B ou le stress oxydatif avant d'identifier l'implication du complexe Cullin3-RBX1 décrit pour interagir avec COMMD2 (Mao et al., 2011). Les résultats du screening nous ont aussi servi a posteriori, car nous y avons retrouvé la culline 3 et RBX1, et nous avons identifié UBE2L6, la ligase E2 impliquée dans le processus.

Cette phase exploratoire a entraîné des hypothèses erronées. Nous avons par exemple fait l'hypothèse d'une mort cellulaire dépendante de la caspase 9, mais n'activant pas les mitochondries. Nous avons formulé cette hypothèse en connaissance des travaux de Jin et al, qui ont démontré la poly-ubiquitination de la caspase-8 par le complexe CRL3, provoquant son agrégation et son activation, et menant à l'apoptose (Jin et al., 2009). Une autre étude plus récente, dans notre laboratoire, portant sur le récepteur à dépendance Patched (voir Introduction, Chapitre 2.1.a.ii), montre l'activation de la caspase-9 par une autre ubiquitine ligase, NEDD4 (Fombonne et al., 2012). Nous avons observé que la mort induite par UNC5B impliquait le complexe CRL3 et l'activation de la caspase-9, nous avons donc émit l'hypothèse d'une activation de la caspase 9 par poly-ubiquitination. Cependant, nous n'avons pas été en mesure de démontrer l'ubiquitination de la caspase-9 par immunoprécipitation. Par ailleurs, nous observions la perméabilisation des mitochondries, ainsi qu'une réversion de la mort cellulaire en utilisant des inhibiteurs du protéasome. Par conséquent, nous avons donc revu notre hypothèse.

Ces difficultés rencontrées ont été coûteuses en temps, ce qui nous a retardé pour développer certains points importants dans l'objectif d'une publication. Tout d'abord, il va être nécessaire de caractériser plus en détail l'ubiquitination de Mcl-1 par immunoprécipitation, et montrer son interaction avec le complexe CRL3. Nous chercherons à démontrer que cette ubiquitination et cette interaction est spécifique de l'induction de UNC5B, et qu'elle peut être inhibé par l'ajout de nétrine-1, ou par l'invalidation des différents membres de la voie de signalisation en amont cette ubiquitination. Ensuite, nous projetons aussi de valider nos données sur d'autres modèles cellulaires sensibles à l'induction de

UNC5B, tels que les T47D, une lignée cellulaire de cancer du sein. Il serait aussi intéressant de caractériser les modèles cellulaires résistants à UNC5B, au regard de nos résultats, et notamment pour les membres de la famille Bcl-2. Des niveaux élevés des autres membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 pourrait expliquer cette résistance. Nous pourrions par exemple, réaliser la méthode du BH3 profiling sur ces lignées, comme cela a déjà été décrit précédemment (Fraser et al., 2019).

Par ailleurs, d'autres résultats du screening, que nous avons validé expérimentalement, méritent notre intérêt dans le futur car ils pourraient être impliqués dans les mécanismes mis à jour lors de ce projet.

2. Considérations mécanistiques

L'approche du screening s'est révélée efficace pour mettre en lumière un mécanisme original par lequel UNC5B pourrait déclencher la mort cellulaire. Toutefois, nous sommes encore loin d'en avoir élucidé tous les acteurs et subtilités, et de nombreuses questions se posent, parmi lesquelles les suivantes :

- La phosphorylation de Mcl-1 est-elle nécessaire à sa dégradation par UNC5B ?

Comme nous l'avons évoqué en chapitre 1-3-f-iv, la phosphorylation de Mcl-1 peut jouer un rôle essentiel dans sa reconnaissance par le système des ubiquitines ligases. L'implication successive des kinases JNK et GSK3 a été mise en évidence dans ce processus par plusieurs études. JNK phosphoryle d'abord Mcl-1 au niveau de Thr63, et cette étape est essentielle pour l'interaction de Mcl-1 avec GSK3 (Morel et al., 2009). Cette deuxième kinase phosphoryle ainsi Mcl-1 au niveau de Ser155 et/ou Ser159, menant ensuite la protéine à sa dégradation par le protéasome (Inuzuka et al., 2011; Maurer et al., 2006). En effet, des mutations au niveau de ces résidus sérines et thréonines stabilisent Mcl-1 suite à l'induction de différents stimuli pro-apoptotiques, et réduisent son ubiquitination (Ding et al., 2007). D'autres kinases telle que CDK1 ont aussi été identifiées pour la phosphorylation de Mcl-1 au niveau d'autres résidus, permettant au contraire la stabilisation de Mcl-1 et renforçant son interaction avec les membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 (Kobayashi et al., 2007).

Bien que plusieurs ubiquitines ligases tel que SCF^{β-TrCP} ou SCF^{Fbw7} aient déjà été identifiées comme dépendantes de ces phosphorylations, il est possible que la dégradation de Mcl-1 par le complexe CRL3 nécessite aussi une ou des phosphorylations préalables. Cette hypothèse pourra être vérifiée en utilisant un mutant de Mcl-1 pour les résidus thréonine et sérine, en invalidant les différentes kinases déjà décrites pour Mcl-1 par interférence ARN ou CRISPR- Krab, ou encore en utilisant des inhibiteurs chimiques de kinase. A l'inverse, il est possible que d'autres phosphorylations permettent aux cellules tumorales d'échapper à la dégradation de Mcl-1 par UNC5B la stabilisant. Ces phosphorylations pourraient être un élément d'explication quant aux résistances de certains modèles cellulaires à l'induction de UNC5B

- La DAPK peut-elle phosphoryler Mcl-1 ?

Outre l'implication des kinases déjà décrites pour la phosphorylation de Mcl-1, d'autres kinases peuvent intervenir dans la voie de mort induite par UNC5B. De précédentes études ont démontré l'implication de la DAPK dans cette voie de mort, grâce à son interaction avec UNC5B. Cette protéine est une kinase intracellulaire à activité sérine-thréonine kinase impliquée dans divers signaux apoptotiques. En absence de nétrine-1, la DAPK est activée par la phosphatase PP2A qui catalyse sa déphosphorylation (Guenebeaud et al., 2010; Llambi et al., 2005). La DAPK induit ensuite la mort médiée par UNC5B, par des mécanismes jusqu'alors inconnus. Lors de ces travaux, nous avons échoué à démontrer l'interaction directe entre UNC5B et le complexe CRL3. Cela peut être expliqué par l'intervention de la DAPK directement sur Mcl-1, entraînant sa phosphorylation en amont de l'ubiquitination **(figure 21)**.

Toutefois, il n'existe pour le moment aucune preuve dans la littérature d'interaction entre la DAPK et Mcl-1. Malgré tout, nous pourrions simplement infirmer ou non cette hypothèse en démontrant l'interaction entre le fragment UNC5B-DAPK et Mcl-1. Nous pourrions aussi invalider la DAPK, ou exprimer une DAPK mutée pour son activité kinase et observer l'effet de cette mutation sur l'induction de la mort et la dégradation de Mcl-1 médiée par UNC5B.

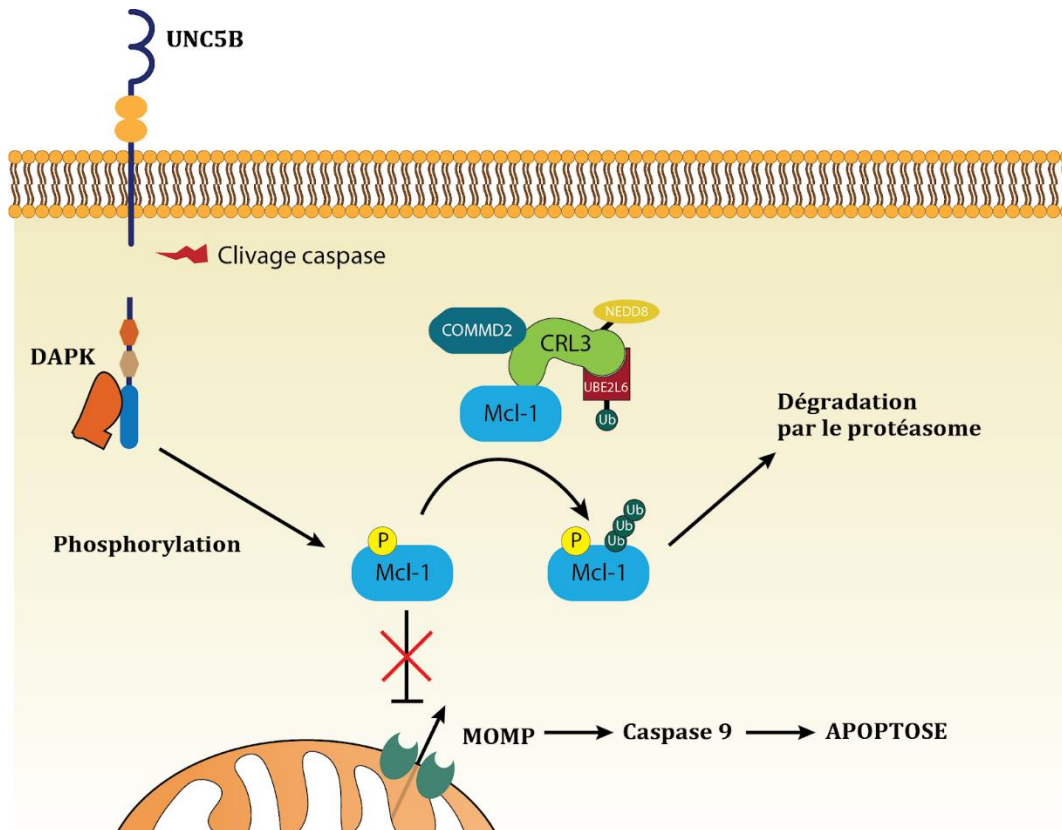


Figure 21 : Schéma hypothétique alternatif de la mort induite par UNC5B

- Quels sont les sites d'ubiquitination impliqués ?

Aux questions portant sur les sites de phosphorylation s'ajoute la question des sites d'ubiquitination impliqués, qui varient dans la littérature suivant l'ubiquitine ligase catalysant la réaction. Sur les 13 sites lysines possibles, cinq sites d'ubiquitinations sont retrouvés sur la protéine (K5, K40, K136, K194 et K197), identifiés lors des travaux de Zhong et al (Zhong et al, 2005) concernant l'ubiquitination de Mcl-1 par Mule. L'approche utilisée pour cette étude a été d'effectuer une mutation spécifique pour chaque site d'ubiquitination possible. De plus, les cellules utilisées expriment une ubiquitine méthylée, permettant d'empêcher la poly-ubiquitination des chaînes, et ainsi de pouvoir mieux analyser les résultats par western blot. Parmi les 5 sites identifiés, Mule ne semble toutefois pas avoir de spécificité particulière.

Pour identifier les sites impliqués dans l'ubiquitination de Mcl-1 par le CRL3, nous pourrions utiliser la même approche, en testant les 5 sites déjà identifiés pour Mule et en incluant aussi les autres résidus lysines présents sur Mcl-1.

- Quel est le rôle de COMMD2 dans l'activation du complexe CRL3 ?

La famille des CRL E3 ligases est principalement régulée par un cycle de neddylation, permettant leur activation et inactivation (Duda et al., 2011). Les CRL E3 ligase sont activées par liaison covalente d'une protéine NEDD8 (Enchev et al., 2015). Par la suite NEDD8 peut être dissocié du complexe par l'action du COP9 (constitutive photomorphogenesis 9) signalosome, ce qui permet à la protéine CAND1 d'interagir avec le complexe non neddylé et d'inhiber son activité (Duda et al., 2011). Dans une étude de 2011, Mao et al démontrent que les membres de la famille COMMD interagissent avec plusieurs cullines, avec des spécificités différentes pour chacun de ses membres (Mao et al., 2011). Par ailleurs, les auteurs montrent que COMMD1, en s'associant avec la culline 2, est capable d'inhiber la liaison de CAND1, et par conséquent active le complexe CRL2. Cette publication montre aussi que la protéine COMMD2 n'interagit pas avec la culline 2 mais avec la culline 3.

Dans notre modèle, nous avons démontré que COMMD2, ainsi que le complexe CRL3 était nécessaire à la mort induite par UNC5B (voir partie Résultats). COMMD1, de son coté, ne semble pas impliqué dans la mort induite par UNC5B (**Figure 22**). Par ailleurs, nous avons aussi pu démontrer que l'inhibition de la neddylation, par l'intermédiaire du pevonedistat, un inhibiteur spécifique de NEDD8, était capable de reverser la mort induite par UNC5B. Nous pouvons ainsi émettre l'hypothèse que COMMD2, en interagissant spécifiquement avec le CRL3, est capable d'inhiber l'interaction de CAND1 avec le CRL3, et provoque donc son activation par neddylation. Pour vérifier cette hypothèse, nous projetons d'observer si la surexpression de la protéine CAND1 est capable d'inhiber la mort induite par UNC5B.

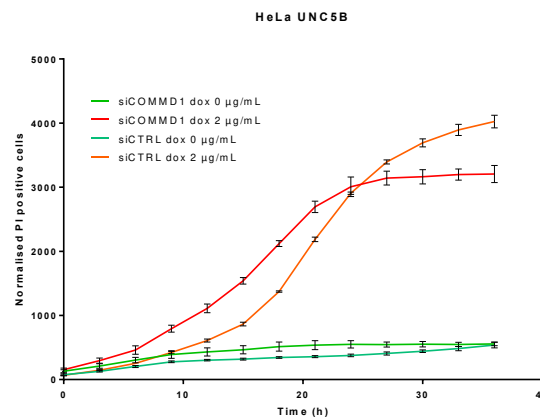


Figure 22: L'inactivation de COMMD1 ne modifie pas la mort induite par UNC5B

Toutes les protéines de la famille COMMD partagent le même domaine COMM en C-ter, leur singularité provenant de leur séquence en N-ter (Bartuzi et al., 2013). Il est donc possible que la spécificité de COMMD2 pour le CRL3 provienne de cette séquence N-ter. Ainsi, nous pourrions tester l'association de différentes protéines COMMD2 tronquées ou mutées avec le CRL3 pour déterminer le site garantissant la spécificité de COMMD2.

- L'ubiquitination de Mcl-1 est-elle un processus impliquant d'autres ubiquitines ligases ?

A ce jour, plusieurs ubiquitines ligase sont reconnues pour dégrader Mcl-1, parmi lesquelles on peut citer Mule, SCF ^{β -TrCP}, SCF^{FBW7}, TRIM17, APC/C^{Cdc20}, MARCH5 ou encore Parkin (Mojsa et al., 2014 ; Senichkin et al., 2020). Le complexe CRL3, lui n'a jamais été décrit dans ce contexte. Ainsi, nos travaux pourraient démontrer l'implication d'une nouvelle E3 ligase dans la dégradation de Mcl-1. Toutefois, pour démontrer cette possibilité, nous envisageons d'invalider les autres E3 ligases connues pour réguler Mcl-1 et d'observer si leur impact sur la mort induite par UNC5B. S'il s'avère que l'invalidation de l'une de ces ubiquitines ligases permet de reverser la mort induite par le récepteur, cela veut dire que le complexe CRL3 n'est pas la seule E3 ligase requise pour cette voie de mort.

L'analyse ontologique des 75 premiers gènes du screening montre un enrichissement important des gènes de la machinerie ubiquitine ligase, avec 24 gènes impliqués dans ces processus (**Figure 23**). Ce résultat ne nous est apparu que tardivement pendant nos travaux, et nous n'avons pas fait de l'analyse et de la validation de ces partenaires possibles une priorité. Cependant, cette donnée est intéressante, car plusieurs études font état d'un fonctionnement complexe du réseau des E3 ligases. Ainsi, ces ligases peuvent s'auto-réguler, par exemple en conduisant les ligases à être dégradées, mais aussi en les activant par le biais d'une ubiquitination non-protéolytique (de Bie and Ciechanover, 2011). Une étude récente de Scott et al (Scott et al., 2016) fait même l'état de deux E3 ligases travaillant de concert pour l'ubiquitination d'un substrat. L'E3 ligase ARIH1, va être activée après interaction à un CRL conjugué à NEDD8, et va catalyser le transfert de son E2 ligase spécifique vers le substrat du CRL. Cette ubiquitination est particulièrement efficace pour le transfert de la première

ubiquitine au substrat, et la réaction se révèle moins efficace pour l'élongation de la chaîne. Cela laisse à penser que le rôle de cette collaboration est l'initiation de la chaîne d'ubiquitine.

Cependant, lors de notre screening, l'E3 ligase ARIH1 n'est pas apparu dans la liste de partenaires possibles. La présence de nombreux composants du réseau des ubiquitines ligase dans cette liste suggère tout de même l'implication d'autres partenaires, que ce soit en collaboration comme dans l'exemple précédent, ou dans un rôle d'activateur par ubiquitination non-protéolytique.

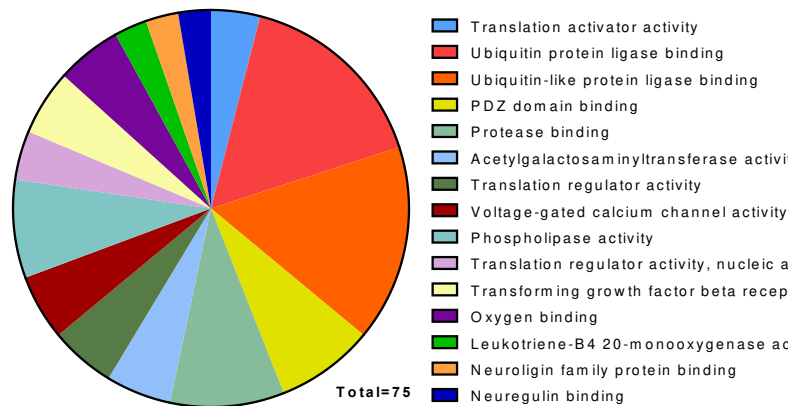


Figure 23: Analyse ontologique des gènes issues du screening DAVID Bioinformatics Resources 6.8 (Huang et al., 2007a).

- Les déubiquitinases (DUBs) peuvent-elles jouer un rôle dans la résistance à l'induction de UNC5B ?

Comme nous l'avons vu en introduction, les DUBs font partie intégrante de la régulation de Mcl-1. En contrant l'action des E3 ligases, elles permettent de stabiliser Mcl-1, et exercent donc une activité anti-apoptotique. Dans le cadre de notre hypothèse, les DUBs seraient un verrou à débloquer pour déclencher l'apoptose induite par UNC5B. Nous pourrions vérifier cette hypothèse dans notre système de lignée inductible pour UNC5B, en surexprimant les DUBs connues pour cibler Mcl-1, telles que USPX9 ou Ku70. Cette surexpression devrait bloquer la mort induite par UNC5B. Inversement, l'inactivation des DUBs dans notre système devrait potentialiser cette mort. De plus, cette mécanique pourrait être exploitée d'un point de vue thérapeutique, en combinant l'anticorps NP137 avec les inhibiteurs des DUBs récemment développés (Wu et al., 2020).

- Quelle est la protéine BTB impliquée dans le complexe CRL3-COMMD2 ?

Les CRL3, en plus de la cullin 3 et de RBX1, sont composés d'une troisième protéine, une protéine BTB (Bric-a-brac/Tramtrack/Broad), servant à la reconnaissance du substrat. Le domaine BTB de ces protéines permet leur liaison avec la partie N-terminale de la culline 3, et l'interaction avec le substrat est garantie par une autre région d'interaction, comprenant typiquement des domaines MATH (meprin and TRAF homology) et Kelch (Jerabkova and Sumara, 2019). Environ 200 protéines BTB ont été identifiées dans le génome humains, mais seules quelques-unes d'entre elles ont été caractérisées pour leur fonction dans le CRL3 (Cheng et al., 2018). Parmi elles, nous avons identifié la protéine KEAP1 qui fait partie des cibles les plus représentées de notre screening. Malgré cela, son invalidation à l'aide de deux siARNs différents n'a pas donné de résultats probants sur la mort induite par UNC5B. Cette piste méritera malgré tout d'être approfondie, car plusieurs facteurs peuvent expliquer le manque d'efficacité des siARN, telle qu'une demi-vie trop longue de la protéine.

- Les autres membres de la famille Bcl-2 jouent-ils un rôle dans l'apoptose induite par UNC5B ?

La famille Bcl-2 forme un réseau de protéines dont l'interaction entre les membres, par le biais des domaines BH3 peut se révéler complexe (Kale et al., 2018). Ces interactions peuvent jouer un rôle dans la régulation des membres la composant. Par exemple, il serait intéressant de savoir si la protéine BH3-only NOXA, qui possède une très bonne affinité pour Mcl-1, peut jouer un rôle dans sa dégradation induite par UNC5B. En effet, une étude récente montre que MARCH5, une ubiquitine ligase, est capable d'ubiquitiner Mcl-1 seulement lorsqu'il est associé à NOXA (Djajawi et al., 2020). Dans notre système, nous pourrions examiner si l'invalidation de NOXA est capable d'inhiber la mort induite par UNC5B.

Par ailleurs, nous envisageons de confirmer que la mort induite par UNC5B se produit par déséquilibre de la balance apoptotique en surexprimant les membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-XL et Mcl-1). La surexpression d'un seul de ces membres devrait empêcher la mort induite par UNC5B.

- Par quel moyens UNC5B active-t-il le complexe COMMD2/CRL3 ?

La plus grande zone d'ombre par rapport à notre hypothèse reste le mécanisme par lequel UNC5B transmet le signal pro-apoptotique et active le complexe COMMD2-CRL3. Pour le moment, nous n'avons pas réussi à démontrer d'interaction directe entre le complexe et UNC5B, et il est possible que cette activation se produise de manière indirecte, comme nous l'avons vu précédemment avec l'hypothèse de la phosphorylation de Mcl-1 par la DAPK. Il est aussi possible que cette activation passe par le biais d'autres partenaires encore inconnus, qui vont permettre de transmettre le signal.

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons réfléchi à l'utilisation d'un système de biotinylation de proximité, nous permettant de marquer puis d'identifier les protéines dans l'environnement proche de UNC5B. Dans ce système, UNC5B est fusionné avec une peroxydase APEX2 (Rhee et al., 2013). En présence de Biotin-phénol, cette peroxydase va oxyder le groupe phénol, le rendre réactif, ce qui va permettre de marquer les protéines à proximité (<20 nm). Ces protéines seront ensuite purifiées sur colonnes de streptavidine puis identifiées par spectrométrie de masse (**Figure 24**). Cette réaction est très courte – environ 1 minute – ce qui permet d'obtenir une « photographie » des protéines à proximité du récepteur à un instant T. En réalisant ce marquage à différents temps d'induction de UNC5B, nous pourrions ainsi mieux comprendre la dynamique de l'induction de la mort de ce récepteur.

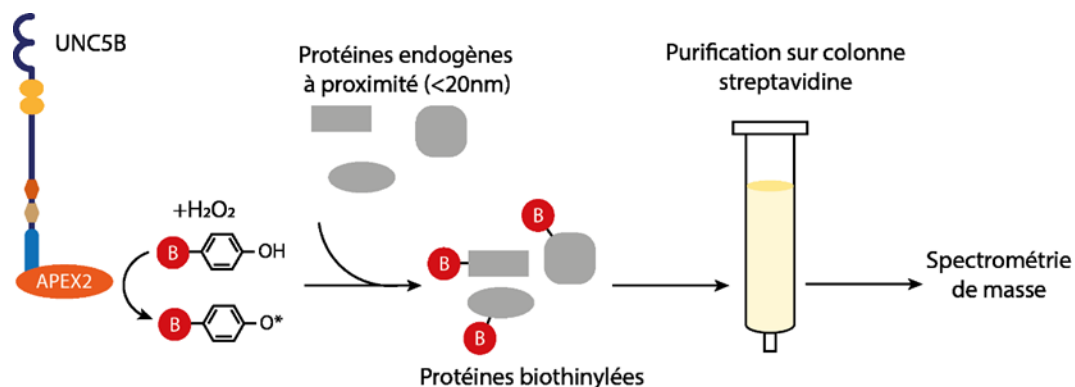


Figure 24: Identification de l'environnement proche du récepteur par biotinylation de proximité

- UNC5B, déclencheur ou facilitateur de l'apoptose ?

Comme nous l'avons évoqué précédemment, nous avons observé très tôt dans le projet une plus grande efficacité de l'induction d'UNC5B pour déclencher la mort cellulaire après déprivation de sérum dans nos cultures cellulaires. Cela peut s'expliquer par la notion de priming à l'apoptose que nous avons évoqué précédemment dans ce manuscrit. Après déprivation en sérum, les cellules tumorales expriment des niveaux croissants de protéine BH3, et deviennent « primées » pour l'apoptose, et ainsi plus sensibles à la dégradation de Mcl-1.

Cette observation ouvre la réflexion sur un rôle facilitateur plutôt que déclencheur de l'apoptose concernant UNC5B. En effet, sans stimulus apoptotique basal, la dégradation de Mcl-1 n'est pas suffisante pour induire l'apoptose. Toutefois, cette hypothèse ne remet pas en cause le rôle de « garde-fou » de UNC5B dans la tumorigénèse, car comme nous l'avons vu en introduction, les cellules tumorales présentent généralement des niveaux de protéines BH3 et Bcl-2 élevés, principalement dus au stress oncogénique.

- Vers la caractérisation d'autres cibles du screening ?

Lors de la validation des partenaires potentiels issus du screening, nous avons pu confirmer l'implication d'autres protéines, parmi lesquelles la Ribophorine1 (RPN1) (**Figure 25**). Cette protéine, associée au protéasome 26S, apparaît être importante pour la réception et la coordination des protéines vers leur dégradation et leur déubiquitination (Rosenzweig et al., 2012). En invalidant cette protéine, nous avons été capable de reverser la mort induite par UNC5B. Ainsi, il est probable que cette protéine joue un rôle crucial dans la reconnaissance et la dégradation de Mcl-1.

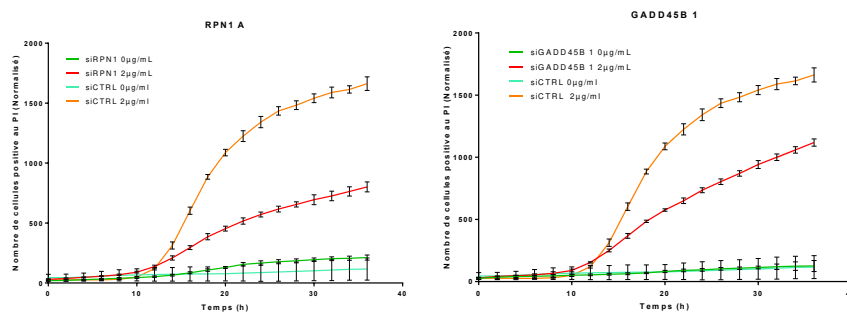


Figure 25 : L'invalidation de RPN1 et GADD45B inhibe la mort induite par UNC5B

En plus de cette protéine, nous avons identifié une autre protéine, GADD45b dont l'invalidation induisait une réversion partielle de la mort induite par UNC5B (**Figure 25**). GADD45 (Growth Arrest and DNA Damage) fait partie de la famille très conservée des GADD45, constituée de GADD45a, GADD45b et GADD45g. Moins présente dans la littérature que GADD45a, GADD45b est connue pour son implication dans des processus d'arrêts du cycle cellulaire et pro-apoptotiques (Salvador et al., 2013). Cependant, nous n'avons pas trouvé d'indice ou de piste reliant notre hypothèse à cette protéine, et il est possible qu'elle soit impliquée dans une voie pro-apoptotique alternative induite par UNC5B, qu'il sera intéressant d'étudier.

Ainsi, les résultats du screening pourront servir de base à d'autres projets concernant les voies de signalisation de UNC5B.

3. Enjeux thérapeutiques

Grâce à cette caractérisation mécanistique, nous avons amélioré notre compréhension des voies pro-apoptotiques induites par l'anticorps NP137 interférant avec la nétrine-1 et son récepteur. Nos résultats montrent que l'anticorps, en induisant la voie apoptotique médiée par UNC5B, pourrait constituer un moyen original de dégrader Mcl-1, et fournirait une alternative intéressante aux BH3 mimétiques actuellement développés.

Comme nous l'avons mentionné en introduction, le développement des BH3 mimétiques, et notamment ceux inhibant spécifiquement Mcl-1, est freiné par plusieurs problèmes. La mise au point d'inhibiteurs chimiques ciblant uniquement et spécifiquement Mcl-1 est compliquée par la rigidité conformationnelle du site de liaison hydrophobe (Lee et al., 2009), ainsi que par l'affinité très forte de cette protéine pour ses ligands endogènes. De plus, de nombreuses interrogations se posent concernant la potentielle toxicité de ces inhibiteurs. Bien que les inhibiteurs récemment mis au point se révèlent très spécifiques, les inquiétudes portent avant tout sur les effets de l'inhibition de Mcl-1 dans les cellules saines. La délétion de Mcl-1 chez la souris aboutit à une léthalité embryonnaire (Rinkenberger et al., 2000). La présence de la protéine anti-apoptotique est cruciale dans de nombreux tissus et types cellulaires, parmi lesquelles les cellules souches hématopoïétiques, l'épithélium du thymus, les cellules lymphoïdes B et T matures et immatures, les cellules T activées, les cardiomyocytes, les cellules neurales ou encore les hépatocytes (Merino et al., 2018).

L'utilisation des inhibiteurs semble toutefois être bien tolérée dans des modèles de souris. Le S63845, par exemple, induit une régression tumorale dans des xénogreffes de lignée de lymphome chez la souris, avec peu d'effets toxiques observés (Kotschy et al., 2016a). Aucun effet notable n'a été observé sur le foie, les poumons, le cœur ou le système musculaire, et seule une baisse transitoire des lymphocytes B immatures dans la moelle osseuse est à déplorer. De manière générale, l'inhibition des membres pro-survie de la famille des Bcl-2 par les BH3 mimétiques se révèle être mieux tolérés par l'organisme qu'une délétion génétique complète. Cela peut s'expliquer par l'aspect transitoire et limité dans le temps de l'action de ces inhibiteurs. De plus, il est possible que les protéines Bcl-2 anti-apoptotiques soient impliquées dans d'autres processus que l'apoptose, tel que la respiration mitochondriale (Perciavalle et al., 2012), l'autophagie (Levine et al., 2008) ou encore le cycle cellulaire (Zinkel, 2006). Ainsi, ces fonctions pourraient ne pas être inhibées par l'action des BH3 mimétiques, contrairement aux délétions génétiques complètes, invalidant l'ensemble des fonctions de la protéine ciblée.

Toutefois, une autre explication pourrait être que ce composé possède une affinité inférieure pour le Mcl-1 de souris comparée au Mcl-1 humain, ce qui en diminue les effets indésirables. Pour vérifier cette hypothèse, une étude de Brennan et al utilise le S63845 sur un modèle de souris transgénique présentant un Mcl-1 humanisé (Brennan et al., 2018). Cette étude montre une meilleure efficacité et une meilleure affinité pour le Mcl-1 humain, mais met tout de même en évidence une décroissance de la population de lymphocytes B au cours du traitement.

Concernant les preuves d'une toxicité possible sur le patient, il est pour le moment difficile d'apporter des conclusions, car les études portant sur les premiers inhibiteurs de Mcl-1 développés sont encore en cours. La mise en suspend récente d'une étude clinique portant sur deux inhibiteurs de Mcl-1, l'AMG 176 (NCT02675452) et l'AMG 397 (NCT03465540), évaluant une possible toxicité cardiaque de ces composés soulève tout de même quelques inquiétudes quant à l'innocuité de ces composés (Wei et al., 2020).

En dégradant Mcl-1 de façon indirecte mais spécifique, le NP137 pourrait être une alternative avantageuse à ce type de composés. En effet, l'innocuité de cet anticorps a déjà été testé en phase clinique I, et a montré une très bonne tolérance chez les patients testés. Le

NP137, en ciblant préférentiellement les cellules tumorales surexprimant la nétrine-1, possède un avantage considérable en comparaison des inhibiteurs chimiques qui eux ciblent sans distinction les cellules tumorales et saines. La bonne tolérance de l'anticorps chez les patients offre la possibilité de l'utiliser en combinaison avec d'autres molécules.

Dans le cas des tumeurs hématopoïétiques, plusieurs études montrent que combiner les BH3 mimétiques pourrait se révéler efficace, avec par exemple des résultats encourageants dans des modèles de LMA (Moujalled et al., 2019; Ramsey et al., 2018).

Concernant les tumeurs solides, la combinaison des BH3 mimétiques pourrait aussi être efficace. Pour le moment, le Venetoclax, ciblant Bcl-2 et seule BH3 mimétique approuvée sur le marché, n'est utilisé que dans le cadre de certaines pathologies hématopoïétiques. De manière générale, les BH3 mimétiques utilisés en monothérapie se révèlent peu efficaces dans des tumeurs solides, souvent moins « primées » à l'apoptose que les tumeurs hématopoïétiques (Sarosiek et al., 2017). Soderquist et al, en 2018, ont cherché à caractériser différentes lignées cellulaires pour leur dépendance aux protéines de la famille Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-XL et Mcl-1), au regard de leur sensibilité aux BH3 mimétiques (Soderquist et al., 2018). L'étude montre que si la grande majorité des tumeurs solides se révèle résistante à l'emploi d'un seul inhibiteur, la combinaison de l'inhibition de deux voire des trois protéines s'avère très efficace. La combinaison des inhibiteurs de Mcl-1 et Bcl-XL, en particulier semble efficace dans une grande portion des tumeurs, et pourrait être prometteuse. Cette association a néanmoins été rapportée comme létale dans des modèles de souris, à cause d'une toxicité aigüe dans le foie (Weeden et al., 2018). L'utilisation de l'anticorps, dans ce cas de figure, pourrait diminuer la toxicité du traitement et permettre des combinaisons avec d'autres BH3 mimétiques.

De nombreuses études mettent aussi en évidence l'efficacité de la combinaison entre des BH3 mimétiques ciblant Mcl-1 et d'autres thérapies ciblées. Dans les tumeurs surexprimant la nétrine-1, nous pourrions envisager ce type de combinaison en remplaçant les BH3 mimétiques ciblant Mcl-1 par le NP137. Par exemple, l'utilisation d'inhibiteurs de Mcl-1 s'est révélée efficace en combinaison avec des inhibiteurs de EGFR, MEK ou B-RAF dans différents sous-types de cancer du poumon (Kotschy et al., 2016a ; Levenson et al., 2015b ; Weeden et al., 2018), ou encore en combinaison avec des chimiothérapies ciblant HER2 dans le cancer du sein (Merino et al., 2017a).

En conclusion, l'utilisation de l'anticorps NP137 pourrait être une option intéressante pour cibler les tumeurs surexprimant la nétrine-1, permettant de cibler Mcl-1 tout en ayant un effet limité sur les cellules saines. Le NP137 pourrait ainsi apporter une réponse face aux réserves actuelles concernant la toxicité de l'utilisation de BH3 mimétiques visant Mcl-1 en combinaison avec d'autres traitements.

Bibliographie

Adams, J.M., and Cory, S. (2018). The BCL-2 arbiters of apoptosis and their growing role as cancer targets. *Cell Death Differ* 25, 27-36.

Ahmed, G., Shinmyo, Y., Ohta, K., Islam, S.M., Hossain, M., Naser, I.B., Riyadh, M.A., Su, Y., Zhang, S., Tessier-Lavigne, M., *et al.* (2011). Draxin inhibits axonal outgrowth through the netrin receptor DCC. *J Neurosci* 31, 14018-14023.

Allan, L.A., Skowyra, A., Rogers, K.I., Zeller, D., and Clarke, P.R. (2018). Atypical APC/C-dependent degradation of Mcl-1 provides an apoptotic timer during mitotic arrest. *EMBO J* 37.

Anstee, N.S., Bilardi, R.A., Ng, A.P., Xu, Z., Robati, M., Vandenberg, C.J., and Cory, S. (2019). Impact of elevated anti-apoptotic MCL-1 and BCL-2 on the development and treatment of MLL-AF9 AML in mice. *Cell Death Differ* 26, 1316-1331.

Arai, S., Varkaris, A., Nouri, M., Chen, S., Xie, L., and Balk, S.P. (2020). MARCH5 mediates NOXA-dependent MCL1 degradation driven by kinase inhibitors and integrated stress response activation. *Elife* 9.

Arakawa, S., Tsujioka, M., Yoshida, T., Tajima-Sakurai, H., Nishida, Y., Matsuoka, Y., Yoshino, I., Tsujimoto, Y., and Shimizu, S. (2017). Role of Atg5-dependent cell death in the embryonic development of Bax/Bak double-knockout mice. *Cell Death Differ* 24, 1598-1608.

Ashkenazi, A., Fairbrother, W.J., Leverson, J.D., and Souers, A.J. (2017). From basic apoptosis discoveries to advanced selective BCL-2 family inhibitors. *Nat Rev Drug Discov* 16, 273-284.

Barbaric, I., Miller, G., and Dear, T.N. (2007). Appearances can be deceiving: phenotypes of knockout mice. *Brief Funct Genomic Proteomic* 6, 91-103.

Barnhart, B.C., Alappat, E.C., and Peter, M.E. (2003). The CD95 type I/type II model. *Semin Immunol* 15, 185-193.

Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., Romero, D.A., and Horvath, P. (2007). CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* 315, 1709-1712.

Bartuzi, P., Hofker, M.H., and van de Sluis, B. (2013). Tuning NF-kappaB activity: a touch of COMMD proteins. *Biochim Biophys Acta* 1832, 2315-2321.

Bennett, E.J., Rush, J., Gygi, S.P., and Harper, J.W. (2010). Dynamics of cullin-RING ubiquitin ligase network revealed by systematic quantitative proteomics. *Cell* 143, 951-965.

Bernet, A., and Fitamant, J. (2008). Netrin-1 and its receptors in tumour growth promotion. *Expert Opin Ther Targets* 12, 995-1007.

Bernet, A., Mazelin, L., Coissieux, M.M., Gadot, N., Ackerman, S.L., Scoazec, J.Y., and Mehlen, P. (2007). Inactivation of the UNC5C Netrin-1 receptor is associated with tumor progression in colorectal malignancies. *Gastroenterology* 133, 1840-1848.

Bernet, A., and Mehlen, P. (2007). Dependence receptors: when apoptosis controls tumor progression. *Bull Cancer* 94, E12-17.

- Beroukhi, R., Mermel, C.H., Porter, D., Wei, G., Raychaudhuri, S., Donovan, J., Barretina, J., Boehm, J.S., Dobson, J., Urashima, M., *et al.* (2010). The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. *Nature* *463*, 899-905.
- Boussouar, A., Tortereau, A., Manceau, A., Paradisi, A., Gadot, N., Vial, J., Neves, D., Larue, L., Battistella, M., Leboeuf, C., *et al.* (2020). Netrin-1 and Its Receptor DCC Are Causally Implicated in Melanoma Progression. *Cancer Res* *80*, 747-756.
- Bouzas-Rodriguez, J., Cabrera, J.R., Delloye-Bourgeois, C., Ichim, G., Delcros, J.G., Raquin, M.A., Rousseau, R., Combaret, V., Benard, J., Tauszig-Delamasure, S., *et al.* (2010). Neurotrophin-3 production promotes human neuroblastoma cell survival by inhibiting TrkC-induced apoptosis. *J Clin Invest* *120*, 850-858.
- Boyer, N.P., and Gupton, S.L. (2018). Revisiting Netrin-1: One Who Guides (Axons). *Front Cell Neurosci* *12*, 221.
- Brennan, M.S., Chang, C., Tai, L., Lessene, G., Strasser, A., Dewson, G., Kelly, G.L., and Herold, M.J. (2018). Humanized Mcl-1 mice enable accurate preclinical evaluation of MCL-1 inhibitors destined for clinical use. *Blood* *132*, 1573-1583.
- Broutier, L., Creveaux, M., Vial, J., Tortereau, A., Delcros, J.G., Chazot, G., McCarron, M.J., Leon, S., Pangault, C., Gadot, N., *et al.* (2016). Targeting netrin-1/DCC interaction in diffuse large B-cell and mantle cell lymphomas. *EMBO Mol Med* *8*, 96-104.
- Burstein, E., Hoberg, J.E., Wilkinson, A.S., Rumble, J.M., Csomos, R.A., Komarck, C.M., Maine, G.N., Wilkinson, J.C., Mayo, M.W., and Duckett, C.S. (2005). COMMD proteins, a novel family of structural and functional homologs of MURR1. *The Journal of biological chemistry* *280*, 22222-22232.
- Caenepeel, S., Brown, S.P., Belmontes, B., Moody, G., Keegan, K.S., Chui, D., Whittington, D.A., Huang, X., Poppe, L., Cheng, A.C., *et al.* (2018). AMG 176, a Selective MCL1 Inhibitor, Is Effective in Hematologic Cancer Models Alone and in Combination with Established Therapies. *Cancer Discov* *8*, 1582-1597.
- Campbell, K.J., Bath, M.L., Turner, M.L., Vandenberg, C.J., Bouillet, P., Metcalf, D., Scott, C.L., and Cory, S. (2010). Elevated Mcl-1 perturbs lymphopoiesis, promotes transformation of hematopoietic stem/progenitor cells, and enhances drug resistance. *Blood* *116*, 3197-3207.
- Carroll, R.G., Hollville, E., and Martin, S.J. (2014). Parkin sensitizes toward apoptosis induced by mitochondrial depolarization through promoting degradation of Mcl-1. *Cell Rep* *9*, 1538-1553.
- Castets, M., Broutier, L., Molin, Y., Brevet, M., Chazot, G., Gadot, N., Paquet, A., Mazelin, L., Jarrosson-Wuilleme, L., Scoazec, J.Y., *et al.* (2011). DCC constrains tumour progression via its dependence receptor activity. *Nature* *482*, 534-537.
- Castets, M., Coissieux, M.M., Delloye-Bourgeois, C., Bernard, L., Delcros, J.G., Bernet, A., Laudet, V., and Mehlen, P. (2009). Inhibition of endothelial cell apoptosis by netrin-1 during angiogenesis. *Dev Cell* *16*, 614-620.
- Castets, M., and Mehlen, P. (2010). Netrin-1 role in angiogenesis: to be or not to be a pro-angiogenic factor? *Cell Cycle* *9*, 1466-1471.
- Castiglioni, P., Martin-Fontecha, A., Milan, G., Tomajer, V., Magni, F., Michaelsson, J., Rugarli, C., Rosato, A., and Bellone, M. (2002). Apoptosis-dependent subversion of the T-lymphocyte epitope hierarchy in lymphoma cells. *Cancer Res* *62*, 1116-1122.

- Causeret, F., Sumia, I., and Pierani, A. (2016). Kremen1 and Dickkopf1 control cell survival in a Wnt-independent manner. *Cell Death Differ* 23, 323-332.
- Cerella, C., Dicato, M., and Diederich, M. (2020). BH3 Mimetics in AML Therapy: Death and Beyond? *Trends Pharmacol Sci* 41, 793-814.
- Cerikan, B., Shaheen, R., Colo, G.P., Glasser, C., Hata, S., Knobloch, K.P., Alkuraya, F.S., Fassler, R., and Schiebel, E. (2016). Cell-Intrinsic Adaptation Arising from Chronic Ablation of a Key Rho GTPase Regulator. *Dev Cell* 39, 28-43.
- Certo, M., Del Gaizo Moore, V., Nishino, M., Wei, G., Korsmeyer, S., Armstrong, S.A., and Letai, A. (2006). Mitochondria primed by death signals determine cellular addiction to antiapoptotic BCL-2 family members. *Cancer Cell* 9, 351-365.
- Chen, J.Y., He, X.X., Ma, C., Wu, X.M., Wan, X.L., Xing, Z.K., Pei, Q.Q., Dong, X.P., Liu, D.X., Xiong, W.C., *et al.* (2017). Netrin-1 promotes glioma growth by activating NF-kappaB via UNC5A. *Sci Rep* 7, 5454.
- Cheng, J., Guo, J., Wang, Z., North, B.J., Tao, K., Dai, X., and Wei, W. (2018). Functional analysis of Cullin 3 E3 ligases in tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer* 1869, 11-28.
- Clarke, P.G., and Clarke, S. (1996). Nineteenth century research on naturally occurring cell death and related phenomena. *Anat Embryol (Berl)* 193, 81-99.
- Claveria, C., Giovinazzo, G., Sierra, R., and Torres, M. (2013). Myc-driven endogenous cell competition in the early mammalian embryo. *Nature* 500, 39-44.
- Coissieux, M.M., Tomsic, J., Castets, M., Hampel, H., Tuupanen, S., Andrieu, N., Comeras, I., Drouet, Y., Lasset, C., Liyanarachchi, S., *et al.* (2011). Variants in the netrin-1 receptor UNC5C prevent apoptosis and increase risk of familial colorectal cancer. *Gastroenterology* 141, 2039-2046.
- Corset, V., Nguyen-Ba-Charvet, K.T., Forcet, C., Moyse, E., Chedotal, A., and Mehlen, P. (2000). Netrin-1-mediated axon outgrowth and cAMP production requires interaction with adenosine A2b receptor. *Nature* 407, 747-750.
- Cui, H., Kong, Y., Xu, M., and Zhang, H. (2013). Notch3 functions as a tumor suppressor by controlling cellular senescence. *Cancer Res* 73, 3451-3459.
- Cui, J., and Placzek, W.J. (2018). Post-Transcriptional Regulation of Anti-Apoptotic BCL2 Family Members. *Int J Mol Sci* 19.
- Czabotar, P.E., Lessene, G., Strasser, A., and Adams, J.M. (2014). Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15, 49-63.
- Dash, R., Azab, B., Quinn, B.A., Shen, X., Wang, X.Y., Das, S.K., Rahmani, M., Wei, J., Hedvat, M., Dent, P., *et al.* (2011). Apogossypol derivative BI-97C1 (Sabutoclax) targeting Mcl-1 sensitizes prostate cancer cells to mda-7/IL-24-mediated toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 8785-8790.
- de Bie, P., and Ciechanover, A. (2011). Ubiquitination of E3 ligases: self-regulation of the ubiquitin system via proteolytic and non-proteolytic mechanisms. *Cell Death Differ* 18, 1393-1402.
- Delbridge, A.R., Grabow, S., Strasser, A., and Vaux, D.L. (2016). Thirty years of BCL-2: translating cell death discoveries into novel cancer therapies. *Nat Rev Cancer* 16, 99-109.
- Delloye-Bourgeois, C., Brambilla, E., Coissieux, M.M., Guenebeaud, C., Pedeux, R., Firlej, V., Cabon, F., Brambilla, C., Mehlen, P., and Bernet, A. (2009a). Interference with netrin-1 and tumor cell death in non-small cell lung cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 101, 237-247.

- Delloye-Bourgeois, C., Fitamant, J., Paradisi, A., Cappellen, D., Douc-Rasy, S., Raquin, M.A., Stupack, D., Nakagawara, A., Rousseau, R., Combaret, V., *et al.* (2009b). Netrin-1 acts as a survival factor for aggressive neuroblastoma. *The Journal of experimental medicine* *206*, 833-847.
- Delloye-Bourgeois, C., Gibert, B., Rama, N., Delcros, J.G., Gadot, N., Scoazec, J.Y., Krauss, R., Bernet, A., and Mehlen, P. (2013). Sonic Hedgehog promotes tumor cell survival by inhibiting CDON proapoptotic activity. *PLoS Biol* *11*, e1001623.
- Dickens, L.S., Boyd, R.S., Jukes-Jones, R., Hughes, M.A., Robinson, G.L., Fairall, L., Schwabe, J.W., Cain, K., and Macfarlane, M. (2012). A death effector domain chain DISC model reveals a crucial role for caspase-8 chain assembly in mediating apoptotic cell death. *Mol Cell* *47*, 291-305.
- Ding, Q., He, X., Hsu, J.M., Xia, W., Chen, C.T., Li, L.Y., Lee, D.F., Liu, J.C., Zhong, Q., Wang, X., *et al.* (2007). Degradation of Mcl-1 by beta-TrCP mediates glycogen synthase kinase 3-induced tumor suppression and chemosensitization. *Mol Cell Biol* *27*, 4006-4017.
- Djajawi, T.M., Liu, L., Gong, J.N., Huang, A.S., Luo, M.J., Xu, Z., Okamoto, T., Call, M.J., Huang, D.C.S., and van Delft, M.F. (2020). MARCH5 requires MTCH2 to coordinate proteasomal turnover of the MCL1:NOXA complex. *Cell Death Differ* *27*, 2484-2499.
- Domina, A.M., Vrana, J.A., Gregory, M.A., Hann, S.R., and Craig, R.W. (2004). MCL1 is phosphorylated in the PEST region and stabilized upon ERK activation in viable cells, and at additional sites with cytotoxic okadaic acid or taxol. *Oncogene* *23*, 5301-5315.
- Duda, D.M., Borg, L.A., Scott, D.C., Hunt, H.W., Hammel, M., and Schulman, B.A. (2008). Structural insights into NEDD8 activation of cullin-RING ligases: conformational control of conjugation. *Cell* *134*, 995-1006.
- Duda, D.M., Scott, D.C., Calabrese, M.F., Zimmerman, E.S., Zheng, N., and Schulman, B.A. (2011). Structural regulation of cullin-RING ubiquitin ligase complexes. *Curr Opin Struct Biol* *21*, 257-264.
- Dumartin, L., Quemener, C., Laklai, H., Herbert, J., Bicknell, R., Bousquet, C., Pyronnet, S., Castronovo, V., Schilling, M.K., Bikfalvi, A., *et al.* (2010). Netrin-1 mediates early events in pancreatic adenocarcinoma progression, acting on tumor and endothelial cells. *Gastroenterology* *138*, 1595-1606, 1606 e1591-1598.
- Easty, D.J., Mitchell, P.J., Patel, K., Florenes, V.A., Spritz, R.A., and Bennett, D.C. (1997). Loss of expression of receptor tyrosine kinase family genes PTK7 and SEK in metastatic melanoma. *Int J Cancer* *71*, 1061-1065.
- Eleftheriou, L.I., Weinberger, C.H., Endrizzi, B.T., Ray, T.L., Chow, S., Tsang, M.W., and Lee, P.K. (2011). The Victory stitch: a novel running v-shaped horizontal mattress suturing technique. *Dermatol Surg* *37*, 1663-1665.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* *35*, 495-516.
- Enchev, R.I., Schulman, B.A., and Peter, M. (2015). Protein neddylation: beyond cullin-RING ligases. *Nat Rev Mol Cell Biol* *16*, 30-44.
- Engelkamp, D. (2002). Cloning of three mouse Unc5 genes and their expression patterns at mid-gestation. *Mech Dev* *118*, 191-197.
- Ewald, L., Dittmann, J., Vogler, M., and Fulda, S. (2019). Side-by-side comparison of BH3-mimetics identifies MCL-1 as a key therapeutic target in AML. *Cell death & disease* *10*, 917.

- Fazeli, A., Dickinson, S.L., Hermiston, M.L., Tighe, R.V., Steen, R.G., Small, C.G., Stoeckli, E.T., Keino-Masu, K., Masu, M., Rayburn, H., *et al.* (1997). Phenotype of mice lacking functional Deleted in colorectal cancer (Dcc) gene. *Nature* *386*, 796-804.
- Fearon, E.R., Cho, K.R., Nigro, J.M., Kern, S.E., Simons, J.W., Ruppert, J.M., Hamilton, S.R., Preisinger, A.C., Thomas, G., Kinzler, K.W., *et al.* (1990). Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers. *Science* *247*, 49-56.
- Fernandez-Marrero, Y., Spinner, S., Kaufmann, T., and Jost, P.J. (2016). Survival control of malignant lymphocytes by anti-apoptotic MCL-1. *Leukemia* *30*, 2152-2159.
- Finlay, B.B., and McFadden, G. (2006). Anti-immunology: evasion of the host immune system by bacterial and viral pathogens. *Cell* *124*, 767-782.
- Fitamant, J., Guenebeaud, C., Coissieux, M.M., Guix, C., Treilleux, I., Scoazec, J.Y., Bachelot, T., Bernet, A., and Mehlen, P. (2008). Netrin-1 expression confers a selective advantage for tumor cell survival in metastatic breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* *105*, 4850-4855.
- Flusberg, D.A., and Sorger, P.K. (2015). Surviving apoptosis: life-death signaling in single cells. *Trends Cell Biol* *25*, 446-458.
- Fombonne, J., Bissey, P.A., Guix, C., Sadoul, R., Thibert, C., and Mehlen, P. (2012). Patched dependence receptor triggers apoptosis through ubiquitination of caspase-9. *Proc Natl Acad Sci U S A* *109*, 10510-10515.
- Forbes, S.A., Beare, D., Boutselakis, H., Bamford, S., Bindal, N., Tate, J., Cole, C.G., Ward, S., Dawson, E., Ponting, L., *et al.* (2017). COSMIC: somatic cancer genetics at high-resolution. *Nucleic Acids Res* *45*, D777-D783.
- Fox, B.P., and Kandpal, R.P. (2004). Invasiveness of breast carcinoma cells and transcript profile: Eph receptors and ephrin ligands as molecular markers of potential diagnostic and prognostic application. *Biochem Biophys Res Commun* *318*, 882-892.
- Fraser, C., Ryan, J., and Sarosiek, K. (2019). BH3 Profiling: A Functional Assay to Measure Apoptotic Priming and Dependencies. *Methods Mol Biol* *1877*, 61-76.
- Fricker, M., Tolkovsky, A.M., Borutaite, V., Coleman, M., and Brown, G.C. (2018). Neuronal Cell Death. *Physiol Rev* *98*, 813-880.
- Fricker, N., Beaudouin, J., Richter, P., Eils, R., Krammer, P.H., and Lavrik, I.N. (2010). Model-based dissection of CD95 signaling dynamics reveals both a pro- and antiapoptotic role of c-FLIPL. *J Cell Biol* *190*, 377-389.
- Fritsch, R.M., Schneider, G., Saur, D., Scheibel, M., and Schmid, R.M. (2007). Translational repression of MCL-1 couples stress-induced eIF2 alpha phosphorylation to mitochondrial apoptosis initiation. *J Biol Chem* *282*, 22551-22562.
- Fu, T.M., Li, Y., Lu, A., Li, Z., Vajjhala, P.R., Cruz, A.C., Srivastava, D.B., DiMaio, F., Penczek, P.A., Siegel, R.M., *et al.* (2016). Cryo-EM Structure of Caspase-8 Tandem DED Filament Reveals Assembly and Regulation Mechanisms of the Death-Inducing Signaling Complex. *Mol Cell* *64*, 236-250.
- Furne, C., Corset, V., Herincs, Z., Cahuzac, N., Hueber, A.O., and Mehlen, P. (2006). The dependence receptor DCC requires lipid raft localization for cell death signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 4128-4133.

- Furne, C., Ricard, J., Cabrera, J.R., Pays, L., Bethea, J.R., Mehlen, P., and Liebl, D.J. (2009). EphrinB3 is an anti-apoptotic ligand that inhibits the dependence receptor functions of EphA4 receptors during adult neurogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1793, 231-238.
- Galluzzi, L., Bravo-San Pedro, J.M., Vitale, I., Aaronson, S.A., Abrams, J.M., Adam, D., Alnemri, E.S., Altucci, L., Andrews, D., Annicchiarico-Petruzzelli, M., *et al.* (2015). Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015. *Cell Death Differ* 22, 58-73.
- Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S.A., Abrams, J.M., Adam, D., Agostinis, P., Alnemri, E.S., Altucci, L., Amelio, I., Andrews, D.W., *et al.* (2018a). Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell death and differentiation*.
- Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S.A., Abrams, J.M., Adam, D., Agostinis, P., Alnemri, E.S., Altucci, L., Amelio, I., Andrews, D.W., *et al.* (2018b). Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ* 25, 486-541.
- Galluzzi, L., Vitale, I., Abrams, J.M., Alnemri, E.S., Baehrecke, E.H., Blagosklonny, M.V., Dawson, T.M., Dawson, V.L., El-Deiry, W.S., Fulda, S., *et al.* (2012). Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ* 19, 107-120.
- Genevois, A.L., Ichim, G., Coissieux, M.M., Lambert, M.P., Laval, F., Goldschneider, D., Jarrosson-Wuilleme, L., Lepinasse, F., Gouysse, G., Herceg, Z., *et al.* (2013). Dependence receptor TrkC is a putative colon cancer tumor suppressor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 3017-3022.
- Gilbert, L.A., Larson, M.H., Morsut, L., Liu, Z., Brar, G.A., Torres, S.E., Stern-Ginossar, N., Brandman, O., Whitehead, E.H., Doudna, J.A., *et al.* (2013). CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes. *Cell* 154, 442-451.
- Glaser, S.P., Lee, E.F., Trounson, E., Bouillet, P., Wei, A., Fairlie, W.D., Izon, D.J., Zuber, J., Rappaport, A.R., Herold, M.J., *et al.* (2012). Anti-apoptotic Mcl-1 is essential for the development and sustained growth of acute myeloid leukemia. *Genes Dev* 26, 120-125.
- Goldschneider, D., and Mehlen, P. (2010). Dependence receptors: a new paradigm in cell signaling and cancer therapy. *Oncogene* 29, 1865-1882.
- Gomez-Bougie, P., Menoret, E., Juin, P., Dousset, C., Pellat-Deceunynck, C., and Amiot, M. (2011). Noxa controls Mule-dependent Mcl-1 ubiquitination through the regulation of the Mcl-1/USP9X interaction. *Biochem Biophys Res Commun* 413, 460-464.
- Grandin, M., Meier, M., Delcros, J.G., Nikodemus, D., Reuten, R., Patel, T.R., Goldschneider, D., Orriss, G., Krahn, N., Boussouar, A., *et al.* (2016). Structural Decoding of the Netrin-1/UNC5 Interaction and its Therapeutical Implications in Cancers. *Cancer cell* 29, 173-185.
- Green, D.R., Ferguson, T., Zitvogel, L., and Kroemer, G. (2009). Immunogenic and tolerogenic cell death. *Nat Rev Immunol* 9, 353-363.
- Guenebeaud, C., Goldschneider, D., Castets, M., Guix, C., Chazot, G., Delloye-Bourgeois, C., Eisenberg-Lerner, A., Shohat, G., Zhang, M., Laudet, V., *et al.* (2010). The dependence receptor UNC5H2/B triggers apoptosis via PP2A-mediated dephosphorylation of DAP kinase. *Molecular cell* 40, 863-876.
- Gupta, I., Singh, K., Varshney, N.K., and Khan, S. (2018). Delineating Crosstalk Mechanisms of the Ubiquitin Proteasome System That Regulate Apoptosis. *Front Cell Dev Biol* 6, 11.

- Hafner, C., Schmitz, G., Meyer, S., Bataille, F., Hau, P., Langmann, T., Dietmaier, W., Landthaler, M., and Vogt, T. (2004). Differential gene expression of Eph receptors and ephrins in benign human tissues and cancers. *Clin Chem* *50*, 490-499.
- Han, J., Goldstein, L.A., Gastman, B.R., Rabinovitz, A., and Rabinowich, H. (2005). Disruption of Mcl-1/Bim complex in granzyme B-mediated mitochondrial apoptosis. *J Biol Chem* *280*, 16383-16392.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* *100*, 57-70.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* *144*, 646-674.
- Haschka, M.D., Karbon, G., Soratroi, C., O'Neill, K.L., Luo, X., and Villunger, A. (2020). MARCH5-dependent degradation of MCL1/NOXA complexes defines susceptibility to antimetabolic drug treatment. *Cell Death Differ* *27*, 2297-2312.
- Hengartner, M.O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature* *407*, 770-776.
- Herrant, M., Jacquelin, A., Marchetti, S., Belhacene, N., Colosetti, P., Luciano, F., and Auburger, P. (2004). Cleavage of Mcl-1 by caspases impaired its ability to counteract Bim-induced apoptosis. *Oncogene* *23*, 7863-7873.
- Huang, D.W., Sherman, B.T., Tan, Q., Collins, J.R., Alvord, W.G., Roayaei, J., Stephens, R., Baseler, M.W., Lane, H.C., and Lempicki, R.A. (2007a). The DAVID Gene Functional Classification Tool: a novel biological module-centric algorithm to functionally analyze large gene lists. *Genome Biol* *8*, R183.
- Huang, D.W., Sherman, B.T., Tan, Q., Kir, J., Liu, D., Bryant, D., Guo, Y., Stephens, R., Baseler, M.W., Lane, H.C., *et al.* (2007b). DAVID Bioinformatics Resources: expanded annotation database and novel algorithms to better extract biology from large gene lists. *Nucleic acids research* *35*, W169-175.
- Huang, K., Zhang, J., O'Neill, K.L., Gurumurthy, C.B., Quadros, R.M., Tu, Y., and Luo, X. (2016). Cleavage by Caspase 8 and Mitochondrial Membrane Association Activate the BH3-only Protein Bid during TRAIL-induced Apoptosis. *J Biol Chem* *291*, 11843-11851.
- Hughes, M.A., Powley, I.R., Jukes-Jones, R., Horn, S., Feoktistova, M., Fairall, L., Schwabe, J.W., Leverkus, M., Cain, K., and MacFarlane, M. (2016). Co-operative and Hierarchical Binding of c-FLIP and Caspase-8: A Unified Model Defines How c-FLIP Isoforms Differentially Control Cell Fate. *Mol Cell* *61*, 834-849.
- Huibregtse, J.M., Scheffner, M., Beaudenon, S., and Howley, P.M. (1995). A family of proteins structurally and functionally related to the E6-AP ubiquitin-protein ligase. *Proc Natl Acad Sci U S A* *92*, 2563-2567.
- Huyghe, A., Furlan, G., Ozmadenci, D., Galonska, C., Charlton, J., Gaume, X., Combemorel, N., Riemenschneider, C., Allegre, N., Zhang, J., *et al.* (2020). Netrin-1 promotes naive pluripotency through Neo1 and Unc5b co-regulation of Wnt and MAPK signalling. *Nat Cell Biol* *22*, 389-400.
- Ichim, G., Genevois, A.L., Menard, M., Yu, L.Y., Coelho-Aguiar, J.M., Llambi, F., Jarrosson-Wuilleme, L., Lefebvre, J., Tulasne, D., Dupin, E., *et al.* (2013). The dependence receptor TrkC triggers mitochondria-dependent apoptosis upon Cobra-1 recruitment. *Mol Cell* *51*, 632-646.
- Igney, F.H., and Krammer, P.H. (2002). Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer* *2*, 277-288.
- Ina, K., Itoh, J., Fukushima, K., Kusugami, K., Yamaguchi, T., Kyokane, K., Imada, A., Binion, D.G., Musso, A., West, G.A., *et al.* (1999). Resistance of Crohn's disease T cells to multiple apoptotic signals is associated with a Bcl-2/Bax mucosal imbalance. *J Immunol* *163*, 1081-1090.

- Inuzuka, H., Shaik, S., Onoyama, I., Gao, D., Tseng, A., Maser, R.S., Zhai, B., Wan, L., Gutierrez, A., Lau, A.W., *et al.* (2011). SCF(FBW7) regulates cellular apoptosis by targeting MCL1 for ubiquitylation and destruction. *Nature* 471, 104-109.
- Ishii, N., Araki, K., Yokobori, T., Gantumur, D., Yamanaka, T., Altan, B., Tsukagoshi, M., Igarashi, T., Watanabe, A., Kubo, N., *et al.* (2017). Reduced FBXW7 expression in pancreatic cancer correlates with poor prognosis and chemotherapeutic resistance via accumulation of MCL1. *Oncotarget* 8, 112636-112646.
- Ishii, N., Wadsworth, W.G., Stern, B.D., Culotti, J.G., and Hedgecock, E.M. (1992). UNC-6, a laminin-related protein, guides cell and pioneer axon migrations in *C. elegans*. *Neuron* 9, 873-881.
- Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M., and Nakata, A. (1987). Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J Bacteriol* 169, 5429-5433.
- Jacobson, M.D., Weil, M., and Raff, M.C. (1997). Programmed cell death in animal development. *Cell* 88, 347-354.
- Jerabkova, K., and Sumara, I. (2019). Cullin 3, a cellular scripter of the non-proteolytic ubiquitin code. *Semin Cell Dev Biol* 93, 100-110.
- Jin, Z., Li, Y., Pitti, R., Lawrence, D., Pham, V.C., Lill, J.R., and Ashkenazi, A. (2009). Cullin3-based polyubiquitination and p62-dependent aggregation of caspase-8 mediate extrinsic apoptosis signaling. *Cell* 137, 721-735.
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A., and Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337, 816-821.
- Jordan, B.W., Dinev, D., LeMellay, V., Troppmair, J., Gotz, R., Wixler, L., Sendtner, M., Ludwig, S., and Rapp, U.R. (2001). Neurotrophin receptor-interacting mage homologue is an inducible inhibitor of apoptosis protein-interacting protein that augments cell death. *J Biol Chem* 276, 39985-39989.
- Jost, P.J., Grabow, S., Gray, D., McKenzie, M.D., Nachbur, U., Huang, D.C., Bouillet, P., Thomas, H.E., Borner, C., Silke, J., *et al.* (2009). XIAP discriminates between type I and type II FAS-induced apoptosis. *Nature* 460, 1035-1039.
- Juin, P., Geneste, O., Gautier, F., Depil, S., and Campone, M. (2013). Decoding and unlocking the BCL-2 dependency of cancer cells. *Nature reviews Cancer* 13, 455-465.
- Julien, O., and Wells, J.A. (2017). Caspases and their substrates. *Cell Death Differ* 24, 1380-1389.
- Kale, J., Osterlund, E.J., and Andrews, D.W. (2018). BCL-2 family proteins: changing partners in the dance towards death. *Cell death and differentiation* 25, 65-80.
- Kavuri, S.M., Geserick, P., Berg, D., Dimitrova, D.P., Feoktistova, M., Siegmund, D., Gollnick, H., Neumann, M., Wajant, H., and Leverkus, M. (2011). Cellular FLICE-inhibitory protein (cFLIP) isoforms block CD95- and TRAIL death receptor-induced gene induction irrespective of processing of caspase-8 or cFLIP in the death-inducing signaling complex. *J Biol Chem* 286, 16631-16646.
- Ke, F.F.S., Vanyai, H.K., Cowan, A.D., Delbridge, A.R.D., Whitehead, L., Grabow, S., Czabotar, P.E., Voss, A.K., and Strasser, A. (2018). Embryogenesis and Adult Life in the Absence of Intrinsic Apoptosis Effectors BAX, BAK, and BOK. *Cell* 173, 1217-1230 e1217.
- Keino-Masu, K., Masu, M., Hinck, L., Leonardo, E.D., Chan, S.S., Culotti, J.G., and Tessier-Lavigne, M. (1996). Deleted in Colorectal Cancer (DCC) encodes a netrin receptor. *Cell* 87, 175-185.

- Kerr, J.F., Wyllie, A.H., and Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26, 239-257.
- Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1996). Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 87, 159-170.
- Kitamura, Y., Shimohama, S., Kamoshima, W., Ota, T., Matsuoka, Y., Nomura, Y., Smith, M.A., Perry, G., Whitehouse, P.J., and Taniguchi, T. (1998). Alteration of proteins regulating apoptosis, Bcl-2, Bcl-x, Bax, Bak, Bad, ICH-1 and CPP32, in Alzheimer's disease. *Brain Res* 780, 260-269.
- Kivioja, J.L., Thanasopoulou, A., Kumar, A., Kontro, M., Yadav, B., Majumder, M.M., Javarappa, K.K., Eldfors, S., Schwaller, J., Porkka, K., *et al.* (2019). Dasatinib and navitoclax act synergistically to target NUP98-NSD1(+)/FLT3-ITD(+) acute myeloid leukemia. *Leukemia* 33, 1360-1372.
- Kobayashi, S., Lee, S.H., Meng, X.W., Mott, J.L., Bronk, S.F., Werneburg, N.W., Craig, R.W., Kaufmann, S.H., and Gores, G.J. (2007). Serine 64 phosphorylation enhances the antiapoptotic function of Mcl-1. *J Biol Chem* 282, 18407-18417.
- Koch, A.W., Mathivet, T., Larrivee, B., Tong, R.K., Kowalski, J., Pibouin-Fragner, L., Bouvree, K., Stawicki, S., Nicholes, K., Rathore, N., *et al.* (2011). Robo4 maintains vessel integrity and inhibits angiogenesis by interacting with UNC5B. *Dev Cell* 20, 33-46.
- Kong, C., Zhan, B., Piao, C., Zhang, Z., Zhu, Y., and Li, Q. (2016). Overexpression of UNC5B in bladder cancer cells inhibits proliferation and reduces the volume of transplantation tumors in nude mice. *BMC Cancer* 16, 892.
- Kotschy, A., Szlavik, Z., Murray, J., Davidson, J., Maragno, A.L., Le Toumelin-Braizat, G., Chanrion, M., Kelly, G.L., Gong, J.N., Moujalled, D.M., *et al.* (2016a). The MCL1 inhibitor S63845 is tolerable and effective in diverse cancer models. *Nature* 538, 477-482.
- Kotschy, A., Szlavik, Z., Murray, J., Davidson, J., Maragno, A.L., Le Toumelin-Braizat, G., Chanrion, M., Kelly, G.L., Gong, J.N., Moujalled, D.M., *et al.* (2016b). The MCL1 inhibitor S63845 is tolerable and effective in diverse cancer models. *Nature* 538, 477-482.
- Kozopas, K.M., Yang, T., Buchan, H.L., Zhou, P., and Craig, R.W. (1993). MCL1, a gene expressed in programmed myeloid cell differentiation, has sequence similarity to BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 3516-3520.
- Lai Wing Sun, K., Correia, J.P., and Kennedy, T.E. (2011). Netrins: versatile extracellular cues with diverse functions. *Development* 138, 2153-2169.
- Lee, E.F., Czabotar, P.E., Yang, H., Sleebs, B.E., Lessene, G., Colman, P.M., Smith, B.J., and Fairlie, W.D. (2009). Conformational changes in Bcl-2 pro-survival proteins determine their capacity to bind ligands. *J Biol Chem* 284, 30508-30517.
- Leonardo, E.D., Hinck, L., Masu, M., Keino-Masu, K., Ackerman, S.L., and Tessier-Lavigne, M. (1997). Vertebrate homologues of *C. elegans* UNC-5 are candidate netrin receptors. *Nature* 386, 833-838.
- Leung-Hagesteijn, C., Spence, A.M., Stern, B.D., Zhou, Y., Su, M.W., Hedgecock, E.M., and Culotti, J.G. (1992). UNC-5, a transmembrane protein with immunoglobulin and thrombospondin type 1 domains, guides cell and pioneer axon migrations in *C. elegans*. *Cell* 71, 289-299.
- Levenson, J.D., Phillips, D.C., Mitten, M.J., Boghaert, E.R., Diaz, D., Tahir, S.K., Belmont, L.D., Nimmer, P., Xiao, Y., Ma, X.M., *et al.* (2015a). Exploiting selective BCL-2 family inhibitors to dissect cell survival dependencies and define improved strategies for cancer therapy. *Sci Transl Med* 7, 279ra240.

- Leverson, J.D., Zhang, H., Chen, J., Tahir, S.K., Phillips, D.C., Xue, J., Nimmer, P., Jin, S., Smith, M., Xiao, Y., *et al.* (2015b). Potent and selective small-molecule MCL-1 inhibitors demonstrate on-target cancer cell killing activity as single agents and in combination with ABT-263 (navitoclax). *Cell Death Dis* 6, e1590.
- Levine, B., Sinha, S.C., and Kroemer, G. (2008). Bcl-2 family members: Dual regulators of apoptosis and autophagy. *Autophagy* 4, 600-606.
- Li, F., He, Z., Shen, J., Huang, Q., Li, W., Liu, X., He, Y., Wolf, F., and Li, C.Y. (2010). Apoptotic caspases regulate induction of iPSCs from human fibroblasts. *Cell Stem Cell* 7, 508-520.
- Li, H., Zhu, H., Xu, C.J., and Yuan, J. (1998). Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 94, 491-501.
- Lin, S., Negulescu, A., Bulusu, S., Gibert, B., Delcros, J.G., Ducarouge, B., Rama, N., Gadot, N., Treilleux, I., Saintigny, P., *et al.* (2017). Non-canonical NOTCH3 signalling limits tumour angiogenesis. *Nature communications* 8, 16074.
- Lindsten, T., Ross, A.J., King, A., Zong, W.X., Rathmell, J.C., Shiels, H.A., Ulrich, E., Waymire, K.G., Mahar, P., Frauwirth, K., *et al.* (2000). The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members bak and bax are essential for normal development of multiple tissues. *Mol Cell* 6, 1389-1399.
- Liu, J., Zhang, Z., Li, Z.H., and Kong, C.Z. (2013). Clinical significance of UNC5B expression in bladder cancer. *Tumour Biol* 34, 2099-2108.
- Liu, Y., Stein, E., Oliver, T., Li, Y., Brunken, W.J., Koch, M., Tessier-Lavigne, M., and Hogan, B.L. (2004). Novel role for Netrins in regulating epithelial behavior during lung branching morphogenesis. *Curr Biol* 14, 897-905.
- Llambi, F., Causeret, F., Bloch-Gallego, E., and Mehlen, P. (2001). Netrin-1 acts as a survival factor via its receptors UNC5H and DCC. *The EMBO journal* 20, 2715-2722.
- Llambi, F., Lourenco, F.C., Gozuacik, D., Guix, C., Pays, L., Del Rio, G., Kimchi, A., and Mehlen, P. (2005). The dependence receptor UNC5H2 mediates apoptosis through DAP-kinase. *The EMBO journal* 24, 1192-1201.
- Lockshin, R.A. (1969). Programmed cell death. Activation of lysis by a mechanism involving the synthesis of protein. *J Insect Physiol* 15, 1505-1516.
- Lomonosova, E., and Chinnadurai, G. (2008). BH3-only proteins in apoptosis and beyond: an overview. *Oncogene* 27 *Suppl 1*, S2-19.
- Lorick, K.L., Jensen, J.P., Fang, S., Ong, A.M., Hatakeyama, S., and Weissman, A.M. (1999). RING fingers mediate ubiquitin-conjugating enzyme (E2)-dependent ubiquitination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 11364-11369.
- Lu, X., Le Noble, F., Yuan, L., Jiang, Q., De Lafarge, B., Sugiyama, D., Breant, C., Claes, F., De Smet, F., Thomas, J.L., *et al.* (2004). The netrin receptor UNC5B mediates guidance events controlling morphogenesis of the vascular system. *Nature* 432, 179-186.
- Luchino, J., Hocine, M., Amoureux, M.C., Gibert, B., Bernet, A., Royet, A., Treilleux, I., Lecine, P., Borg, J.P., Mehlen, P., *et al.* (2013). Semaphorin 3E suppresses tumor cell death triggered by the plexin D1 dependence receptor in metastatic breast cancers. *Cancer Cell* 24, 673-685.
- Luedde, T., Kaplowitz, N., and Schwabe, R.F. (2014). Cell death and cell death responses in liver disease: mechanisms and clinical relevance. *Gastroenterology* 147, 765-783 e764.

- Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C., and Wang, X. (1998). Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 94, 481-490.
- Lydeard, J.R., Schulman, B.A., and Harper, J.W. (2013). Building and remodelling Cullin-RING E3 ubiquitin ligases. *EMBO Rep* 14, 1050-1061.
- Madden, S.D., Donovan, M., and Cotter, T.G. (2007). Key apoptosis regulating proteins are down-regulated during postnatal tissue development. *Int J Dev Biol* 51, 415-423.
- Magiera, M.M., Mora, S., Mojsa, B., Robbins, I., Lassot, I., and Desagher, S. (2013). Trim17-mediated ubiquitination and degradation of Mcl-1 initiate apoptosis in neurons. *Cell Death Differ* 20, 281-292.
- Maisse, C., Rossin, A., Cahuzac, N., Paradisi, A., Klein, C., Haillet, M.L., Herincs, Z., Mehlen, P., and Hueber, A.O. (2008). Lipid raft localization and palmitoylation: identification of two requirements for cell death induction by the tumor suppressors UNC5H. *Exp Cell Res* 314, 2544-2552.
- Maji, S., Panda, S., Samal, S.K., Shriwas, O., Rath, R., Pellecchia, M., Emdad, L., Das, S.K., Fisher, P.B., and Dash, R. (2018). Bcl-2 Antiapoptotic Family Proteins and Chemoresistance in Cancer. *Adv Cancer Res* 137, 37-75.
- Maji, S., Samal, S.K., Pattanaik, L., Panda, S., Quinn, B.A., Das, S.K., Sarkar, D., Pellecchia, M., Fisher, P.B., and Dash, R. (2015). Mcl-1 is an important therapeutic target for oral squamous cell carcinomas. *Oncotarget* 6, 16623-16637.
- Mao, X., Gluck, N., Chen, B., Starokadomskyy, P., Li, H., Maine, G.N., and Burstein, E. (2011). COMMD1 (copper metabolism MURR1 domain-containing protein 1) regulates Cullin RING ligases by preventing CAND1 (Cullin-associated Nedd8-dissociated protein 1) binding. *J Biol Chem* 286, 32355-32365.
- Mata, A., Gil, V., Perez-Clausell, J., Dasilva, M., Gonzalez-Calixto, M.C., Soriano, E., Garcia-Verdugo, J.M., Sanchez-Vives, M.V., and Del Rio, J.A. (2018). New functions of Semaphorin 3E and its receptor PlexinD1 during developing and adult hippocampal formation. *Sci Rep* 8, 1381.
- Maurer, U., Charvet, C., Wagman, A.S., Dejardin, E., and Green, D.R. (2006). Glycogen synthase kinase-3 regulates mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis by destabilization of MCL-1. *Mol Cell* 21, 749-760.
- Mazelin, L., Bernet, A., Bonod-Bidaud, C., Pays, L., Arnaud, S., Gespach, C., Bredesen, D.E., Scoazec, J.Y., and Mehlen, P. (2004). Netrin-1 controls colorectal tumorigenesis by regulating apoptosis. *Nature* 431, 80-84.
- Mazumder, S., Choudhary, G.S., Al-Harbi, S., and Almasan, A. (2012). Mcl-1 Phosphorylation defines ABT-737 resistance that can be overcome by increased NOXA expression in leukemic B cells. *Cancer Res* 72, 3069-3079.
- Mehlen, P., and Guenebeaud, C. (2010). Netrin-1 and its dependence receptors as original targets for cancer therapy. *Curr Opin Oncol* 22, 46-54.
- Mehlen, P., and Puisieux, A. (2006). Metastasis: a question of life or death. *Nat Rev Cancer* 6, 449-458.
- Mehlen, P., Rabizadeh, S., Snipas, S.J., Assa-Munt, N., Salvesen, G.S., and Bredesen, D.E. (1998). The DCC gene product induces apoptosis by a mechanism requiring receptor proteolysis. *Nature* 395, 801-804.

- Menard, M., Costechareyre, C., Ichim, G., Blachier, J., Neves, D., Jarrosson-Wuilleme, L., Depping, R., Koster, J., Saintigny, P., Mehlen, P., *et al.* (2018). Hey1- and p53-dependent TrkC proapoptotic activity controls neuroblastoma growth. *PLoS Biol* 16, e2002912.
- Merino, D., Kelly, G.L., Lessene, G., Wei, A.H., Roberts, A.W., and Strasser, A. (2018). BH3-Mimetic Drugs: Blazing the Trail for New Cancer Medicines. *Cancer cell* 34, 879-891.
- Merino, D., Strasser, A., and Bouillet, P. (2012). Bim must be able to engage all pro-survival Bcl-2 family members for efficient tumor suppression. *Oncogene* 31, 3392-3396.
- Mérino, D., Strasser, A., and Bouillet, P. (2012). Bim must be able to engage all pro-survival Bcl-2 family members for efficient tumor suppression. *Oncogene* 31, 3392-3396.
- Merino, D., Whittle, J.R., Vaillant, F., Serrano, A., Gong, J.N., Giner, G., Maragno, A.L., Chanrion, M., Schneider, E., Pal, B., *et al.* (2017a). Synergistic action of the MCL-1 inhibitor S63845 with current therapies in preclinical models of triple-negative and HER2-amplified breast cancer. *Sci Transl Med* 9.
- Merino, D., Whittle, J.R., Vaillant, F., Serrano, A., Gong, J.N., Giner, G., Maragno, A.L., Chanrion, M., Schneider, E., Pal, B., *et al.* (2017b). Synergistic action of the MCL-1 inhibitor S63845 with current therapies in preclinical models of triple-negative and HER2-amplified breast cancer. *Science translational medicine* 9.
- Meynier, S., and Rieux-Laucat, F. (2019). FAS and RAS related Apoptosis defects: From autoimmunity to leukemia. *Immunol Rev* 287, 50-61.
- Micheau, O., Thome, M., Schneider, P., Holler, N., Tschopp, J., Nicholson, D.W., Briand, C., and Grutter, M.G. (2002). The long form of FLIP is an activator of caspase-8 at the Fas death-inducing signaling complex. *J Biol Chem* 277, 45162-45171.
- Mille, F., Llambi, F., Guix, C., Delloye-Bourgeois, C., Guenebeaud, C., Castro-Obregon, S., Bredesen, D.E., Thibert, C., and Mehlen, P. (2009a). Interfering with multimerization of netrin-1 receptors triggers tumor cell death. *Cell Death Differ* 16, 1344-1351.
- Mille, F., Thibert, C., Fombonne, J., Rama, N., Guix, C., Hayashi, H., Corset, V., Reed, J.C., and Mehlen, P. (2009b). The Patched dependence receptor triggers apoptosis through a DRAL-caspase-9 complex. *Nat Cell Biol* 11, 739-746.
- Mirakaj, V., and Rosenberger, P. (2017). Immunomodulatory Functions of Neuronal Guidance Proteins. *Trends Immunol* 38, 444-456.
- Miyashita, T., and Reed, J.C. (1995). Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 80, 293-299.
- Mojsa, B., Lassot, I., and Desagher, S. (2014). Mcl-1 ubiquitination: unique regulation of an essential survival protein. *Cells* 3, 418-437.
- Montero, J., and Letai, A. (2018). Why do BCL-2 inhibitors work and where should we use them in the clinic? *Cell Death Differ* 25, 56-64.
- Morel, C., Carlson, S.M., White, F.M., and Davis, R.J. (2009). Mcl-1 integrates the opposing actions of signaling pathways that mediate survival and apoptosis. *Mol Cell Biol* 29, 3845-3852.
- Moshynska, O., Sankaran, K., Pahwa, P., and Saxena, A. (2004). Prognostic significance of a short sequence insertion in the MCL-1 promoter in chronic lymphocytic leukemia. *J Natl Cancer Inst* 96, 673-682.

- Moujalled, D.M., Pomilio, G., Ghiurau, C., Ivey, A., Salmon, J., Rijal, S., Macrauld, S., Zhang, L., Teh, T.C., Tiong, I.S., *et al.* (2019). Combining BH3-mimetics to target both BCL-2 and MCL1 has potent activity in pre-clinical models of acute myeloid leukemia. *Leukemia* 33, 905-917.
- Natali, P.G., Berlingieri, M.T., Nicotra, M.R., Fusco, A., Santoro, E., Bigotti, A., and Vecchio, G. (1995). Transformation of thyroid epithelium is associated with loss of c-kit receptor. *Cancer Res* 55, 1787-1791.
- Natali, P.G., Nicotra, M.R., Sures, I., Mottolose, M., Botti, C., and Ullrich, A. (1992a). Breast cancer is associated with loss of the c-kit oncogene product. *Int J Cancer* 52, 713-717.
- Natali, P.G., Nicotra, M.R., Sures, I., Santoro, E., Bigotti, A., and Ullrich, A. (1992b). Expression of c-kit receptor in normal and transformed human nonlymphoid tissues. *Cancer Res* 52, 6139-6143.
- Negulescu, A.M., and Mehlen, P. (2018). Dependence receptors - the dark side awakens. *The FEBS journal* 285, 3909-3924.
- Opferman, J.T., Iwasaki, H., Ong, C.C., Suh, H., Mizuno, S., Akashi, K., and Korsmeyer, S.J. (2005). Obligate role of anti-apoptotic MCL-1 in the survival of hematopoietic stem cells. *Science* 307, 1101-1104.
- Opferman, J.T., Letai, A., Beard, C., Sorcinelli, M.D., Ong, C.C., and Korsmeyer, S.J. (2003). Development and maintenance of B and T lymphocytes requires antiapoptotic MCL-1. *Nature* 426, 671-676.
- Ozmadenci, D., Feraud, O., Markossian, S., Kress, E., Ducarouge, B., Gibert, B., Ge, J., Durand, I., Gadot, N., Plateroti, M., *et al.* (2015). Netrin-1 regulates somatic cell reprogramming and pluripotency maintenance. *Nat Commun* 6, 7398.
- Pan, R., Ruvolo, V.R., Wei, J., Konopleva, M., Reed, J.C., Pellicchia, M., Andreeff, M., and Ruvolo, P.P. (2015). Inhibition of Mcl-1 with the pan-Bcl-2 family inhibitor (-)BI97D6 overcomes ABT-737 resistance in acute myeloid leukemia. *Blood* 126, 363-372.
- Paradisi, A., Creveaux, M., Gibert, B., Devailly, G., Redoulez, E., Neves, D., Cleysac, E., Treilleux, I., Klein, C., Niederfellner, G., *et al.* (2013). Combining chemotherapeutic agents and netrin-1 interference potentiates cancer cell death. *EMBO molecular medicine* 5, 1821-1834.
- Paradisi, A., Maise, C., Bernet, A., Coissieux, M.M., Maccarrone, M., Scoazec, J.Y., and Mehlen, P. (2008). NF-kappaB regulates netrin-1 expression and affects the conditional tumor suppressive activity of the netrin-1 receptors. *Gastroenterology* 135, 1248-1257.
- Paradisi, A., Maise, C., Coissieux, M.M., Gadot, N., Lepinasse, F., Delloye-Bourgeois, C., Delcros, J.G., Svrcek, M., Neufert, C., Flejou, J.F., *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, 17146-17151.
- Parrales, A., and Iwakuma, T. (2015). Targeting Oncogenic Mutant p53 for Cancer Therapy. *Front Oncol* 5, 288.
- Peddaboina, C., Jupiter, D., Fletcher, S., Yap, J.L., Rai, A., Tobin, R.P., Jiang, W., Rascoe, P., Rogers, M.K., Smythe, W.R., *et al.* (2012). The downregulation of Mcl-1 via USP9X inhibition sensitizes solid tumors to Bcl-xl inhibition. *BMC Cancer* 12, 541.
- Perciavalle, R.M., Stewart, D.P., Koss, B., Lynch, J., Milasta, S., Bathina, M., Temirov, J., Cleland, M.M., Pelletier, S., Schuetz, J.D., *et al.* (2012). Anti-apoptotic MCL-1 localizes to the mitochondrial matrix and couples mitochondrial fusion to respiration. *Nat Cell Biol* 14, 575-583.

- Pihan, P., Carreras-Sureda, A., and Hetz, C. (2017). BCL-2 family: integrating stress responses at the ER to control cell demise. *Cell Death Differ* 24, 1478-1487.
- Placzek, W.J., Wei, J., Kitada, S., Zhai, D., Reed, J.C., and Pellecchia, M. (2010). A survey of the anti-apoptotic Bcl-2 subfamily expression in cancer types provides a platform to predict the efficacy of Bcl-2 antagonists in cancer therapy. *Cell Death Dis* 1, e40.
- Rabizadeh, S., Oh, J., Zhong, L.T., Yang, J., Bitler, C.M., Butcher, L.L., and Bredesen, D.E. (1993). Induction of apoptosis by the low-affinity NGF receptor. *Science* 261, 345-348.
- Rajasekharan, S., and Kennedy, T.E. (2009). The netrin protein family. *Genome Biol* 10, 239.
- Rama, N., Goldschneider, D., Corset, V., Lambert, J., Pays, L., and Mehlen, P. (2012). Amyloid precursor protein regulates netrin-1-mediated commissural axon outgrowth. *J Biol Chem* 287, 30014-30023.
- Ramsey, H.E., Fischer, M.A., Lee, T., Gorska, A.E., Arrate, M.P., Fuller, L., Boyd, K.L., Strickland, S.A., Sensintaffar, J., Hogdal, L.J., *et al.* (2018). A Novel MCL1 Inhibitor Combined with Venetoclax Rescues Venetoclax-Resistant Acute Myelogenous Leukemia. *Cancer Discov* 8, 1566-1581.
- Rawson, P.M., Molette, C., Videtta, M., Altieri, L., Franceschini, D., Donato, T., Finocchi, L., Propato, A., Paroli, M., Meloni, F., *et al.* (2007). Cross-presentation of caspase-cleaved apoptotic self antigens in HIV infection. *Nat Med* 13, 1431-1439.
- Ren, H., Koo, J., Guan, B., Yue, P., Deng, X., Chen, M., Khuri, F.R., and Sun, S.Y. (2013). The E3 ubiquitin ligases beta-TrCP and FBXW7 cooperatively mediates GSK3-dependent Mcl-1 degradation induced by the Akt inhibitor API-1, resulting in apoptosis. *Mol Cancer* 12, 146.
- Rhee, H.W., Zou, P., Udeshi, N.D., Martell, J.D., Mootha, V.K., Carr, S.A., and Ting, A.Y. (2013). Proteomic mapping of mitochondria in living cells via spatially restricted enzymatic tagging. *Science* 339, 1328-1331.
- Riera-Romo, M. (2018). COMMD1: A Multifunctional Regulatory Protein. *J Cell Biochem* 119, 34-51.
- Rinkenberger, J.L., Horning, S., Klocke, B., Roth, K., and Korsmeyer, S.J. (2000). Mcl-1 deficiency results in peri-implantation embryonic lethality. *Genes Dev* 14, 23-27.
- Roos, W.P., Thomas, A.D., and Kaina, B. (2016). DNA damage and the balance between survival and death in cancer biology. *Nat Rev Cancer* 16, 20-33.
- Rosenzweig, R., Bronner, V., Zhang, D., Fushman, D., and Glickman, M.H. (2012). Rpn1 and Rpn2 coordinate ubiquitin processing factors at proteasome. *J Biol Chem* 287, 14659-14671.
- Rossi, A., Kontarakis, Z., Gerri, C., Nolte, H., Holper, S., Kruger, M., and Stainier, D.Y. (2015). Genetic compensation induced by deleterious mutations but not gene knockdowns. *Nature* 524, 230-233.
- Salehi, A.H., Xanthoudakis, S., and Barker, P.A. (2002). NRAGE, a p75 neurotrophin receptor-interacting protein, induces caspase activation and cell death through a JNK-dependent mitochondrial pathway. *J Biol Chem* 277, 48043-48050.
- Salvador, J.M., Brown-Clay, J.D., and Fornace, A.J., Jr. (2013). Gadd45 in stress signaling, cell cycle control, and apoptosis. *Adv Exp Med Biol* 793, 1-19.
- Sanjana, N.E., Shalem, O., and Zhang, F. (2014). Improved vectors and genome-wide libraries for CRISPR screening. *Nat Methods* 11, 783-784.

- Sarosiek, K.A., Fraser, C., Muthalagu, N., Bhola, P.D., Chang, W., McBrayer, S.K., Cantlon, A., Fisch, S., Golomb-Mello, G., Ryan, J.A., *et al.* (2017). Developmental Regulation of Mitochondrial Apoptosis by c-Myc Governs Age- and Tissue-Specific Sensitivity to Cancer Therapeutics. *Cancer Cell* 31, 142-156.
- Sato, N., Yamabuki, T., Takano, A., Koinuma, J., Aragaki, M., Masuda, K., Ishikawa, N., Kohno, N., Ito, H., Miyamoto, M., *et al.* (2010). Wnt inhibitor Dickkopf-1 as a target for passive cancer immunotherapy. *Cancer Res* 70, 5326-5336.
- Saunders, J.W., Jr. (1966). Death in embryonic systems. *Science* 154, 604-612.
- Scheffold, A., Jebaraj, B.M.C., and Stilgenbauer, S. (2018). Venetoclax: Targeting BCL2 in Hematological Cancers. *Recent Results Cancer Res* 212, 215-242.
- Schuler, F., Baumgartner, F., Klepsch, V., Chamson, M., Muller-Holzner, E., Watson, C.J., Oh, S., Hennighausen, L., Tymoszyk, P., Doppler, W., *et al.* (2016). The BH3-only protein BIM contributes to late-stage involution in the mouse mammary gland. *Cell Death Differ* 23, 41-51.
- Schwickart, M., Huang, X., Lill, J.R., Liu, J., Ferrando, R., French, D.M., Maecker, H., O'Rourke, K., Bazan, F., Eastham-Anderson, J., *et al.* (2010). Deubiquitinase USP9X stabilizes MCL1 and promotes tumour cell survival. *Nature* 463, 103-107.
- Scott, D.C., Rhee, D.Y., Duda, D.M., Kelsall, I.R., Olszewski, J.L., Paulo, J.A., de Jong, A., Ovaas, H., Alpi, A.F., Harper, J.W., *et al.* (2016). Two Distinct Types of E3 Ligases Work in Unison to Regulate Substrate Ubiquitylation. *Cell* 166, 1198-1214 e1124.
- Senichkin, V.V., Streletskaia, A.Y., Gorbunova, A.S., Zhivotovsky, B., and Kopeina, G.S. (2020). Saga of Mcl-1: regulation from transcription to degradation. *Cell Death Differ* 27, 405-419.
- Serafini, T., Kennedy, T.E., Galko, M.J., Mirzayan, C., Jessell, T.M., and Tessier-Lavigne, M. (1994). The netrins define a family of axon outgrowth-promoting proteins homologous to *C. elegans* UNC-6. *Cell* 78, 409-424.
- Shalem, O., Sanjana, N.E., Hartenian, E., Shi, X., Scott, D.A., Mikkelsen, T., Heckl, D., Ebert, B.L., Root, D.E., Doench, J.G., *et al.* (2014). Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells. *Science* 343, 84-87.
- Shiiba, I., Takeda, K., Nagashima, S., and Yanagi, S. (2020). Overview of Mitochondrial E3 Ubiquitin Ligase MITOL/MARCH5 from Molecular Mechanisms to Diseases. *Int J Mol Sci* 21.
- Shin, S.K., Nagasaka, T., Jung, B.H., Matsubara, N., Kim, W.H., Carethers, J.M., Boland, C.R., and Goel, A. (2007). Epigenetic and genetic alterations in Netrin-1 receptors UNC5C and DCC in human colon cancer. *Gastroenterology* 133, 1849-1857.
- Sieghart, W., Losert, D., Strommer, S., Cejka, D., Schmid, K., Rasoul-Rockenschaub, S., Bodingbauer, M., Crevenna, R., Monia, B.P., Peck-Radosavljevic, M., *et al.* (2006). Mcl-1 overexpression in hepatocellular carcinoma: a potential target for antisense therapy. *J Hepatol* 44, 151-157.
- Singh, R., Letai, A., and Sarosiek, K. (2019). Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins. *Nature reviews Molecular cell biology* 20, 175-193.
- Sloss, O., Topham, C., Diez, M., and Taylor, S. (2016). Mcl-1 dynamics influence mitotic slippage and death in mitosis. *Oncotarget* 7, 5176-5192.
- Sly, L.M., Hingley-Wilson, S.M., Reiner, N.E., and McMaster, W.R. (2003). Survival of Mycobacterium tuberculosis in host macrophages involves resistance to apoptosis dependent upon induction of antiapoptotic Bcl-2 family member Mcl-1. *J Immunol* 170, 430-437.

- Soderquist, R.S., Crawford, L., Liu, E., Lu, M., Agarwal, A., Anderson, G.R., Lin, K.H., Winter, P.S., Cakir, M., and Wood, K.C. (2018). Systematic mapping of BCL-2 gene dependencies in cancer reveals molecular determinants of BH3 mimetic sensitivity. *Nature communications* 9, 3513.
- Soucy, T.A., Smith, P.G., Milhollen, M.A., Berger, A.J., Gavin, J.M., Adhikari, S., Brownell, J.E., Burke, K.E., Cardin, D.P., Critchley, S., *et al.* (2009). An inhibitor of NEDD8-activating enzyme as a new approach to treat cancer. *Nature* 458, 732-736.
- Souers, A.J., Levenson, J.D., Boghaert, E.R., Ackler, S.L., Catron, N.D., Chen, J., Dayton, B.D., Ding, H., Enschede, S.H., Fairbrother, W.J., *et al.* (2013a). ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets. *Nat Med* 19, 202-208.
- Souers, A.J., Levenson, J.D., Boghaert, E.R., Ackler, S.L., Catron, N.D., Chen, J., Dayton, B.D., Ding, H., Enschede, S.H., Fairbrother, W.J., *et al.* (2013b). ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets. *Nature medicine* 19, 202-208.
- Southwell, D.G., Paredes, M.F., Galvao, R.P., Jones, D.L., Froemke, R.C., Sebe, J.Y., Alfaro-Cervello, C., Tang, Y., Garcia-Verdugo, J.M., Rubenstein, J.L., *et al.* (2012). Intrinsically determined cell death of developing cortical interneurons. *Nature* 491, 109-113.
- Srinivasan, K., Strickland, P., Valdes, A., Shin, G.C., and Hinck, L. (2003). Netrin-1/neogenin interaction stabilizes multipotent progenitor cap cells during mammary gland morphogenesis. *Dev Cell* 4, 371-382.
- Subramanian, A., Andronache, A., Li, Y.C., and Wade, M. (2016). Inhibition of MARCH5 ubiquitin ligase abrogates MCL1-dependent resistance to BH3 mimetics via NOXA. *Oncotarget* 7, 15986-16002.
- Sung, P.J., Rama, N., Imbach, J., Fiore, S., Ducarouge, B., Neves, D., Chen, H.W., Bernard, D., Yang, P.C., Bernet, A., *et al.* (2019). Cancer-Associated Fibroblasts Produce Netrin-1 to Control Cancer Cell Plasticity. *Cancer Res* 79, 3651-3661.
- Szlavik, Z., Csekei, M., Paczal, A., Szabo, Z.B., Sipos, S., Radics, G., Proszenyak, A., Balint, B., Murray, J., Davidson, J., *et al.* (2020). Discovery of S64315, a Potent and Selective Mcl-1 Inhibitor. *J Med Chem*.
- Tadagavadi, R.K., Wang, W., and Ramesh, G. (2010). Netrin-1 regulates Th1/Th2/Th17 cytokine production and inflammation through UNC5B receptor and protects kidney against ischemia-reperfusion injury. *J Immunol* 185, 3750-3758.
- Tanaka, Y., Aikawa, K., Nishida, G., Homma, M., Sogabe, S., Igaki, S., Hayano, Y., Sameshima, T., Miyahisa, I., Kawamoto, T., *et al.* (2013). Discovery of potent Mcl-1/Bcl-xL dual inhibitors by using a hybridization strategy based on structural analysis of target proteins. *J Med Chem* 56, 9635-9645.
- Tang, X., Jang, S.W., Okada, M., Chan, C.B., Feng, Y., Liu, Y., Luo, S.W., Hong, Y., Rama, N., Xiong, W.C., *et al.* (2008). Netrin-1 mediates neuronal survival through PIKE-L interaction with the dependence receptor UNC5B. *Nat Cell Biol* 10, 698-706.
- Tanikawa, C., Matsuda, K., Fukuda, S., Nakamura, Y., and Arakawa, H. (2003). p53RDL1 regulates p53-dependent apoptosis. *Nat Cell Biol* 5, 216-223.
- Tao, T.Y., Liu, F., Klomp, L., Wijmenga, C., and Gitlin, J.D. (2003). The copper toxicosis gene product Murr1 directly interacts with the Wilson disease protein. *J Biol Chem* 278, 41593-41596.
- Tauszig-Delamasure, S., Yu, L.Y., Cabrera, J.R., Bouzas-Rodriguez, J., Mermet-Bouvier, C., Guix, C., Bordeaux, M.C., Arumae, U., and Mehlen, P. (2007). The TrkC receptor induces apoptosis when the

- dependence receptor notion meets the neurotrophin paradigm. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 13361-13366.
- Teng, X., Dayhoff-Brannigan, M., Cheng, W.C., Gilbert, C.E., Sing, C.N., Diny, N.L., Wheelan, S.J., Dunham, M.J., Boeke, J.D., Pineda, F.J., *et al.* (2013). Genome-wide consequences of deleting any single gene. *Mol Cell* *52*, 485-494.
- Thakore, P.I., D'Ippolito, A.M., Song, L., Safi, A., Shivakumar, N.K., Kabadi, A.M., Reddy, T.E., Crawford, G.E., and Gersbach, C.A. (2015). Highly specific epigenome editing by CRISPR-Cas9 repressors for silencing of distal regulatory elements. *Nat Methods* *12*, 1143-1149.
- Thibert, C., Teillet, M.A., Lapointe, F., Mazelin, L., Le Douarin, N.M., and Mehlen, P. (2003). Inhibition of neuroepithelial patched-induced apoptosis by sonic hedgehog. *Science* *301*, 843-846.
- Thiebault, K., Mazelin, L., Pays, L., Llambi, F., Joly, M.O., Scoazec, J.Y., Saurin, J.C., Romeo, G., and Mehlen, P. (2003). The netrin-1 receptors UNC5H are putative tumor suppressors controlling cell death commitment. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 4173-4178.
- Thomas, R.L., Roberts, D.J., Kubli, D.A., Lee, Y., Quinsay, M.N., Owens, J.B., Fischer, K.M., Sussman, M.A., Miyamoto, S., and Gustafsson, A.B. (2013). Loss of MCL-1 leads to impaired autophagy and rapid development of heart failure. *Genes Dev* *27*, 1365-1377.
- Tong, J., Zheng, X., Tan, X., Fletcher, R., Nikolovska-Coleska, Z., Yu, J., and Zhang, L. (2018). Mcl-1 Phosphorylation without Degradation Mediates Sensitivity to HDAC Inhibitors by Liberating BH3-Only Proteins. *Cancer Res* *78*, 4704-4715.
- Tron, A.E., Belmonte, M.A., Adam, A., Aquila, B.M., Boise, L.H., Chiarparin, E., Cidado, J., Embrey, K.J., Gangl, E., Gibbons, F.D., *et al.* (2018). Discovery of Mcl-1-specific inhibitor AZD5991 and preclinical activity in multiple myeloma and acute myeloid leukemia. *Nat Commun* *9*, 5341.
- van de Sluis, B., Muller, P., Duran, K., Chen, A., Groot, A.J., Klomp, L.W., Liu, P.P., and Wijmenga, C. (2007). Increased activity of hypoxia-inducible factor 1 is associated with early embryonic lethality in *Commd1* null mice. *Mol Cell Biol* *27*, 4142-4156.
- van Gils, J.M., Derby, M.C., Fernandes, L.R., Ramkhelawon, B., Ray, T.D., Rayner, K.J., Parathath, S., Distel, E., Feig, J.L., Alvarez-Leite, J.I., *et al.* (2012). The neuroimmune guidance cue netrin-1 promotes atherosclerosis by inhibiting the emigration of macrophages from plaques. *Nat Immunol* *13*, 136-143.
- Verma, S., Zhao, L.J., and Chinnadurai, G. (2001). Phosphorylation of the pro-apoptotic protein BIK: mapping of phosphorylation sites and effect on apoptosis. *J Biol Chem* *276*, 4671-4676.
- Vick, B., Weber, A., Urbanik, T., Maass, T., Teufel, A., Krammer, P.H., Opferman, J.T., Schuchmann, M., Galle, P.R., and Schulze-Bergkamen, H. (2009). Knockout of myeloid cell leukemia-1 induces liver damage and increases apoptosis susceptibility of murine hepatocytes. *Hepatology* *49*, 627-636.
- Wajant, H. (2002). The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science* *296*, 1635-1636.
- Wang, H., Boussouar, A., Mazelin, L., Tauszig-Delamasure, S., Sun, Y., Goldschneider, D., Paradisi, A., and Mehlen, P. (2018). The Proto-oncogene c-Kit Inhibits Tumor Growth by Behaving as a Dependence Receptor. *Molecular cell* *72*, 413-425 e415.
- Wang, H., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A., and Tessier-Lavigne, M. (1999). Netrin-3, a mouse homolog of human NTN2L, is highly expressed in sensory ganglia and shows differential binding to netrin receptors. *J Neurosci* *19*, 4938-4947.

- Wang, Q., Wan, J., Zhang, W., and Hao, S. (2019). MCL-1 or BCL-xL-dependent resistance to the BCL-2 antagonist (ABT-199) can be overcome by specific inhibitor as single agents and in combination with ABT-199 in acute myeloid leukemia cells. *Leuk Lymphoma* *60*, 2170-2180.
- Wang, R., Wei, Z., Jin, H., Wu, H., Yu, C., Wen, W., Chan, L.N., Wen, Z., and Zhang, M. (2009). Autoinhibition of UNC5b revealed by the cytoplasmic domain structure of the receptor. *Mol Cell* *33*, 692-703.
- Warr, M.R., Acoca, S., Liu, Z., Germain, M., Watson, M., Blanchette, M., Wing, S.S., and Shore, G.C. (2005). BH3-ligand regulates access of MCL-1 to its E3 ligase. *FEBS Lett* *579*, 5603-5608.
- Weeden, C.E., Ah-Cann, C., Holik, A.Z., Pasquet, J., Garnier, J.M., Merino, D., Lessene, G., and Asselin-Labat, M.L. (2018). Dual inhibition of BCL-XL and MCL-1 is required to induce tumour regression in lung squamous cell carcinomas sensitive to FGFR inhibition. *Oncogene* *37*, 4475-4488.
- Wei, A.H., Roberts, A.W., Spencer, A., Rosenberg, A.S., Siegel, D., Walter, R.B., Caenepeel, S., Hughes, P., McIver, Z., Mezzi, K., *et al.* (2020). Targeting MCL-1 in hematologic malignancies: Rationale and progress. *Blood reviews* *44*, 100672.
- Wei, G., Twomey, D., Lamb, J., Schlis, K., Agarwal, J., Stam, R.W., Opferman, J.T., Sallan, S.E., den Boer, M.L., Pieters, R., *et al.* (2006). Gene expression-based chemical genomics identifies rapamycin as a modulator of MCL1 and glucocorticoid resistance. *Cancer Cell* *10*, 331-342.
- Wicking, C., and McGlinn, E. (2001). The role of hedgehog signalling in tumorigenesis. *Cancer Lett* *173*, 1-7.
- Williams, D.W., Kondo, S., Krzyzanowska, A., Hiromi, Y., and Truman, J.W. (2006a). Local caspase activity directs engulfment of dendrites during pruning. *Nat Neurosci* *9*, 1234-1236.
- Williams, M.E., Lu, X., McKenna, W.L., Washington, R., Boyette, A., Strickland, P., Dillon, A., Kaprielian, Z., Tessier-Lavigne, M., and Hinck, L. (2006b). UNC5A promotes neuronal apoptosis during spinal cord development independent of netrin-1. *Nat Neurosci* *9*, 996-998.
- Wilson, B.D., Ii, M., Park, K.W., Suli, A., Sorensen, L.K., Larrieu-Lahargue, F., Urness, L.D., Suh, W., Asai, J., Kock, G.A., *et al.* (2006). Netrins promote developmental and therapeutic angiogenesis. *Science* *313*, 640-644.
- Wu, X., Luo, Q., and Liu, Z. (2020). Ubiquitination and deubiquitination of MCL1 in cancer: deciphering chemoresistance mechanisms and providing potential therapeutic options. *Cell Death Dis* *11*, 556.
- Wuilleme-Toumi, S., Robillard, N., Gomez, P., Moreau, P., Le Gouill, S., Avet-Loiseau, H., Harousseau, J.L., Amiot, M., and Bataille, R. (2005). Mcl-1 is overexpressed in multiple myeloma and associated with relapse and shorter survival. *Leukemia* *19*, 1248-1252.
- Xie, Z., Huang, L., Enkhjargal, B., Reis, C., Wan, W., Tang, J., Cheng, Y., and Zhang, J.H. (2018). Recombinant Netrin-1 binding UNC5B receptor attenuates neuroinflammation and brain injury via PPARgamma/NFkappaB signaling pathway after subarachnoid hemorrhage in rats. *Brain Behav Immun* *69*, 190-202.
- Yamagishi, S., Hampel, F., Hata, K., Del Toro, D., Schwark, M., Kvachnina, E., Bastmeyer, M., Yamashita, T., Tarabykin, V., Klein, R., *et al.* (2011). FLRT2 and FLRT3 act as repulsive guidance cues for Unc5-positive neurons. *EMBO J* *30*, 2920-2933.

- Yan, J., Zhong, N., Liu, G., Chen, K., Liu, X., Su, L., and Singhal, S. (2014). Usp9x- and Noxa-mediated Mcl-1 downregulation contributes to pemetrexed-induced apoptosis in human non-small-cell lung cancer cells. *Cell Death Dis* 5, e1316.
- Yang, M., Huang, W., Sun, Y., Liang, H., Chen, M., Wu, X., Wang, X., Zhang, L., Cheng, X., Fan, Y., *et al.* (2019). Prognosis and modulation mechanisms of COMMD6 in human tumours based on expression profiling and comprehensive bioinformatics analysis. *Br J Cancer* 121, 699-709.
- Yebra, M., Montgomery, A.M., Diaferia, G.R., Kaido, T., Silletti, S., Perez, B., Just, M.L., Hildbrand, S., Hurford, R., Florkiewicz, E., *et al.* (2003). Recognition of the neural chemoattractant Netrin-1 by integrins alpha6beta4 and alpha3beta1 regulates epithelial cell adhesion and migration. *Dev Cell* 5, 695-707.
- Yin, X.M., Wang, K., Gross, A., Zhao, Y., Zinkel, S., Klocke, B., Roth, K.A., and Korsmeyer, S.J. (1999). Bid-deficient mice are resistant to Fas-induced hepatocellular apoptosis. *Nature* 400, 886-891.
- Zhang, H., Nimmer, P.M., Tahir, S.K., Chen, J., Fryer, R.M., Hahn, K.R., Iciek, L.A., Morgan, S.J., Nasarre, M.C., Nelson, R., *et al.* (2007). Bcl-2 family proteins are essential for platelet survival. *Cell death and differentiation* 14, 943-951.
- Zhang, X., Liu, X., Luo, J., Xiao, W., Ye, X., Chen, M., Li, Y., and Zhang, G.J. (2016). Notch3 inhibits epithelial-mesenchymal transition by activating Kibra-mediated Hippo/YAP signaling in breast cancer epithelial cells. *Oncogenesis* 5, e269.
- Zhong, Q., Gao, W., Du, F., and Wang, X. (2005). Mule/ARF-BP1, a BH3-only E3 ubiquitin ligase, catalyzes the polyubiquitination of Mcl-1 and regulates apoptosis. *Cell* 121, 1085-1095.
- Zhou, X.M., Liu, Y., Payne, G., Lutz, R.J., and Chittenden, T. (2000). Growth factors inactivate the cell death promoter BAD by phosphorylation of its BH3 domain on Ser155. *J Biol Chem* 275, 25046-25051.
- Zhu, Y., Li, Y., Haraguchi, S., Yu, M., Ohira, M., Ozaki, T., Nakagawa, A., Ushijima, T., Isogai, E., Koseki, H., *et al.* (2013). Dependence receptor UNC5D mediates nerve growth factor depletion-induced neuroblastoma regression. *J Clin Invest* 123, 2935-2947.
- Zinkel, J.L. (2006). Postischemic reperfusion: ultrastructural blood-brain barrier and hemodynamic correlative changes in an awake model of transient forebrain ischemia. *Neurosurgery* 59, E1152.
- Zong, W.X., Edelstein, L.C., Chen, C., Bash, J., and Gelinas, C. (1999). The prosurvival Bcl-2 homolog Bfl-1/A1 is a direct transcriptional target of NF-kappaB that blocks TNFalpha-induced apoptosis. *Genes Dev* 13, 382-387.

Annexes

ANNEXE 1

Netrin-1 and Its Receptor DCC Are Causally Implicated in Melanoma Progression

Cancer Research, accepté en 2019

Amina Boussouar¹, Antonin Tortereau^{1,2}, Ambroise Manceau¹, Andrea Paradisi¹, Nicolas Gadot², Jonathan Vial¹, David Neves³, Lionel Larue^{4,5,6}, Maxime Battistella⁷, Christophe Leboeuf⁷, Celeste Lebbé⁸, Anne Janin⁷, and Patrick Mehlen^{1,2}

¹Apoptosis, Cancer and Development Laboratory - Equipe labellisée ‘La Ligue’, LabEx DEVweCAN, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, INSERM U1052-CNRS UMR5286, Université de Lyon, Centre Léon Bérard, Lyon, France.

²Department of Translational Research and Innovation, Centre Léon Bérard, Lyon, France. ³Netris Pharma, Lyon, France.

⁴Institut Curie, PSL Research University, INSERM U1021, Normal and Pathological Development of Melanocytes, Orsay, France. ⁵Univ Paris-Sud, Univ Paris-Saclay, CNRS UMR3347, Orsay, France.

⁶Equipe Labellisée Ligue Contre le Cancer, Orsay, France.

⁷Université Paris Diderot, Inserm, UMR_S1165, Paris, France, Laboratoire de pathologie, Hôpital Saint Louis, APHP, Paris, France.

⁸Service de dermatologie, Hôpital Saint Louis, APHP, Paris, France.

Corresponding Author: Patrick Mehlen, University of Lyon-CRCL, Centre Léon Bérard, 28 rue Laennec, Lyon 69008, France. Phone: 334-7878-2870; Fax: 334-7878-2887; E-mail: patrick.mehlen@lyon.unicancer.fr

Netrin-1 and Its Receptor DCC Are Causally Implicated in Melanoma Progression

Amina Boussouar¹, Antonin Tortereau^{1,2}, Ambroise Manceau¹, Andrea Paradisi¹, Nicolas Gadot², Jonathan Vial¹, David Neves³, Lionel Larue^{4,5,6}, Maxime Battistella⁷, Christophe Leboeuf⁷, Celeste Lebbé⁸, Anne Janin⁷, and Patrick Mehlen^{1,2}



ABSTRACT

Deleted in colorectal cancer (DCC), the receptor for the multifunctional cue netrin-1, acts as a tumor suppressor in intestinal cancer and lung metastasis by triggering cancer cell death when netrin-1 is lowly expressed. Recent genomic data highlighted that DCC is the third most frequently mutated gene in melanoma; we therefore investigated whether DCC could act as a melanoma tumor suppressor. Reexpressing DCC in human melanoma cell lines promoted tumor cell death and tumor growth inhibition in xenograft mouse models. Genetic silencing of DCC prodeath activity in a BRAF^{V600E} mouse model increased the proportion of mice with melanoma, further supporting that DCC is a melanoma tumor suppressor. Netrin-1 expression was elevated in melanoma com-

pared with benign melanocytic lesions. Upregulation of netrin-1 in the skin cells of a BRAF^{V600E}-mutated murine model reduced cancer cell death and promoted melanoma progression. Therapeutic antibody blockade of netrin-1 combined with dacarbazine increased overall survival in several mouse melanoma models. Together, these data support that interfering with netrin-1 could be a viable therapeutic approach in patients with netrin-1-expressing melanoma.

Significance: Netrin-1 and its receptor DCC regulate melanoma progression, suggesting therapeutic targeting of this signaling axis as a viable option for melanoma treatment.

Introduction

Vogelstein and colleagues identified *deleted in colorectal cancer* (DCC) as a gene frequently silenced in cancer because of LOH on chromosome 18q. DCC expression is markedly reduced in more than 50% of colorectal tumors as well as in many other neoplasms (1). Moreover, loss of DCC is associated with poor prognosis and potentially decreased response to adjuvant chemotherapy in patients with colorectal cancer. Finally, restoration of DCC expression can suppress tumorigenic growth properties *in vitro* and in nude mice (1). These findings led to the proposal that DCC expression is a constraint for tumor progression, and thus DCC functions as a tumor suppressor gene. However, the localization of the DCC gene close to well-established tumor suppressors such as *Smad4* (2) and the absence of increased tumor susceptibility in a mouse model, in which DCC was inactivated (3), created skepticism about its potential role as a tumor

suppressor gene (4). However the more recent use of conditional DCC-mutant mouse model have demonstrated that DCC inactivation is associated with increased tumoral progression (5).

DCC, a large 200 kDa transmembrane receptor, belongs to the family of dependence receptors (6). Such receptors induce apoptosis when their trophic ligands are absent, thus conferring a state of cellular dependence on ligand availability for survival (7), and this has been proposed to confer a tumor suppressive activity to these dependence receptors (7, 8). To address this hypothesis, we generated a mouse model in which the DCC locus is point-mutated in Asp1290 to specifically silence the prodeath activity of the receptor without impacting DCC non-cell death signaling (9). These mice spontaneously develop more colorectal cancers and lymphomas than age-matched control animals and are more prone to develop metastatic intestinal adenocarcinoma when backcrossed in an APC-mutant background (9, 10).

Of interest, while loss of DCC has been extensively described in cancer, studies have emerged showing that the ligand of DCC, netrin-1, is also implicated in cancer progression. Netrin-1 was initially discovered as a navigation cue during the development of the nervous system and a key factor for brain wiring (11). Although initially described as a diffusible cue guiding, via long distance processes, different types of axons (12), netrin-1 is currently regarded as a laminin-related sticky protein acting at short distance (13) via its main receptors, DCC and UNC5-Homolog (UNC5H- i.e., UNC5A, UNC5B, UNC5C, and UNC5D; ref. 14). Indeed, netrin-1 appears to be a multifunctional secreted protein that plays key roles in neuronal navigation, angiogenesis, and cell survival (15), and as a consequence, has been associated with numerous diseases including diabetes, cardiovascular diseases, and cancers (15). In the latter case, netrin-1 is often reported to be upregulated, and this upregulation was proposed to act as a selective mechanism blocking apoptosis induced by the dependence receptors DCC and UNC5H (15). Consistently, netrin-1 expression in brain metastases is an independent poor prognostic factor for patient survival (16). Moreover, netrin-1 detection in blood or urine has been proposed to be a predictive marker for

¹Apoptosis, Cancer and Development Laboratory - Equipe labellisée 'La Ligue', LabEx DEVweCAN, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, INSERM U1052-CNRS UMR5286, Université de Lyon, Centre Léon Bérard, Lyon, France.

²Department of Translational Research and Innovation, Centre Léon Bérard, Lyon, France. ³Netris Pharma, Lyon, France. ⁴Institut Curie, PSL Research University, INSERM U1021, Normal and Pathological Development of Melanocytes, Orsay, France. ⁵Univ Paris-Sud, Univ Paris-Saclay, CNRS UMR3347, Orsay, France. ⁶Equipe Labellisée Ligue Contre le Cancer, Orsay, France. ⁷Université Paris Diderot, Inserm, UMR_S1165, Paris, France, Laboratoire de pathologie, Hôpital Saint Louis, APHP, Paris, France. ⁸Service de dermatologie, Hôpital Saint Louis, APHP, Paris, France.

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

Corresponding Author: Patrick Mehlen, University of Lyon-CRCL, Centre Léon Bérard, 28 rue Laennec, Lyon 69008, France. Phone: 334-7878-2870; Fax: 334-7878-2887; E-mail: patrick.mehlen@lyon.unicancer.fr

Cancer Res 2020;80:747-56

doi: 10.1158/0008-5472.CAN-18-1590

©2019 American Association for Cancer Research.

Boussouar et al.

cancers (17, 18). Netrin-1 upregulation has been reported not only in cancer cells but also in cancer-associated fibroblasts (19). Efforts to develop drugs that inhibit the interaction of netrin-1 with its receptors are therefore ongoing. Several preclinical proof-of-concept studies have shown that candidate drugs interfering with netrin-1-receptor interactions, either used alone or in combination with conventional chemotherapies or epidrugs, markedly inhibit tumor growth and metastasis development (18, 20, 21). A humanized anti-netrin-1 mAb, also called NP137, has been developed previously (20) and the interim results of a phase I clinical trial have recently been reported (22), showing promising signs of antitumor activity in monotherapy in patients with advanced solid tumors.

While the *DCC* gene was initially thought to be rarely mutated in cancers, Krauthammer and colleagues identified the *DCC* gene as the third most frequently mutated gene in sun-exposed melanoma (23). On the basis of this observation and as melanoma still represent a significant clinical challenge (24–26), we investigated the role of the netrin-1/*DCC* pair in this cancer. We reveal that the netrin-1/*DCC* pair is causally implicated in disease progression and propose that netrin-1 interference could be an attractive therapeutic perspective for treating melanoma.

Materials and Methods

Patients and tumor samples

A total of 241 patients underwent surgery for skin melanocytic lesions between January 2007 and January 2011 and had enough tissue sample remaining after the diagnosis had been established. According to the French Bioethics law of August 2004, the patients were informed of the research use of the remaining samples and were not opposed to it. The research protocol was approved by the Ethics committee of Saint Louis Hospital. All 241 patients signed a written informed consent (IRB 00006477).

The sample series included (i) 36 benign melanocytic lesions: 30 common melanocytic nevi (20 intradermal type, five compound type, and five junctional type) and six dysplastic nevi (four compound type and two junctional type); (ii) 205 malignant melanoma including 25 *in situ* melanoma, 40 melanoma with a Breslow tumor thickness of less than 1 mm, 40 melanoma with a Breslow tumor thickness between 1 and 2 mm, 50 melanoma with a Breslow tumor thickness between 2 and 4 mm, and 50 melanoma with a Breslow tumor thickness more than to 4 mm.

Patient follow-up over 2–5 years showed that, at the time of the study, in the 36 patients with benign melanocytic lesions there was no metastasis, whereas in the 205 patients with malignant melanoma, 125 had metastases either in the lymph node or in viscera.

IHC

An indirect immunoperoxidase method was performed on 5- μ m thick tissue sections. A polyclonal goat anti-human netrin-1 antibody (AF1109, R&D Systems) was used as primary antibody. A donkey anti-goat biotinylated antibody (ab97108 Abcam) was used as secondary antibody. A DABMap Detection Kit (Roche Diagnostic) was used for detection of the biotinylated antibody. Systematic controls were performed for each slide, including: (i) the absence of primary antibody, and (ii) the use as primary antibody of an irrelevant antibody of the same isotype as the primary antibody.

Quantitative *in situ* analyses

A Provis AX70 microscope (Olympus) was used. With a wide-field eyepiece number 26.5, it provided a field size of 0.344 mm² at 400 \times

magnification. Two pathologists (A. Janin and M. Battistella) independently analyzed netrin-1 expression on five different fields at magnification 400 \times for each tissue section. To assess the number of positively stained cells, they used a semi-quantitative scoring system ranging from 1 to 4: 1: 0–25%; 2: 25–50%; 3: 50–75%; and 4: >75%. Staining intensity was recorded using a similar semi-quantitative approach as follows: 1: weak staining; 2: moderate staining; and 3: strong staining.

Cell culture

The 23 melanoma cell lines and a normal melanocyte cell line (FM516SV) were obtained from the ATTC and cultured in DMEM1X + GlutaMAX + 4.5 g/L D-Glucose + Pyruvate Medium (Gibco by Life Technologies) containing 10% FBS. Routine *Mycoplasma* testing was performed by MycoAlert Mycoplasma Detection Kit (catalog no. LT07-118). Melanoma cells grown for no more than 20 passages were used in all the experiments.

qRT-PCR

To analyze the expression of netrin-1, total RNAs of the different melanoma cell lines and of the normal melanocyte cell line (FM516SV) were extracted using the Nucleospin RNAII Kit (Macherey-Nagel). RNA (1 μ g) was reverse transcribed using the iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad). Expression was assessed by real-time quantitative RT-PCR with specific primers available upon request, on a LightCycler 480 Apparatus (Roche) using the LightCycler TaqMan Master Kit (Roche). Reaction conditions for optimal amplification of each gene, as well as primer sequences are available upon request. The ubiquitously expressed *HPRT* was used as an internal calibrator. In addition, total RNAs from xenograft tumors were extracted by disrupting tissues with MagNA Lyser Instrument (Roche Applied Science). RT-PCR reactions were performed with PrimeScript RT Reagent Kit (Takara). Five-hundred nanogram total RNA was reverse transcribed using the following conditions: 37°C for 15 minutes and 85°C for 5 seconds. For expression studies, the target transcripts were amplified on a LightCycler2.0 Apparatus (Roche Applied Science), using the Premix Ex Taq Probe qPCR Kit (Takara), according to the manufacturer's instructions. Expression of target genes (*DCC*) was normalized against glucuronidase beta (*GUSB*) and TATA-binding protein (*TBP*), used as housekeeping genes. The amount of target transcripts, normalized against the housekeeping gene, was calculated using the comparative C_t method.

Plasmid constructs and transfection

For the generation of inducible stable cell lines, HA-tagged human *DCC* coding sequence was cloned at *NheI*/*AgeI* restriction sites in the pCW57.1-hygro plasmid, a self-inactivating HIV-1-derived vector allowing the doxycycline inducible expression of *DCC*, as well as the constitutive expression of rtTA protein and hygromycin resistance gene, expressed under the control of the mouse phosphoglycerate kinase (*PGK*) promoter. Cloning of HA-tagged *DCC* was performed using Infusion Cloning Kit (Clontech). pCW57.1-hygro plasmid was derived from pCW57.1 (Addgene plasmid #41393) by exchanging puromycin to hygromycin resistance. Stable cell clones were selected for 5 days in hygromycin-containing medium and inducible cell lines were further tested for *DCC* expression in response to doxycycline by Western blot analysis.

Western blot analysis

For immunoblotting analysis of *DCC*, inducible cell lines were treated with doxycycline for 24 hours in a medium containing 10%

serum. Cells were then lysed in SDS buffer (10 mmol/L Tris-HCl, 10% glycerol, 5% SDS, 1% TX100, and 0.1 mol/L DTT) in the presence of protease inhibitor mixture (Roche Applied Science) and phosphatase inhibitor (Sigma). Lysates were then sonicated and incubated for 10 minutes at 95°C, and protein extracts (20 µg per lane) were loaded onto 4%–15% SDS-polyacrylamide gels (Bio-Rad) and blotted onto nitrocellulose membranes using Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad). Filters were blocked with 10% non-fat dried milk in PBS/0.1% Tween 20 (PBS-T) for 2 hours and then incubated over night with a rabbit polyclonal α -HA (1:1,000, Sigma) and a rabbit polyclonal α -GAPDH (1:4,000, Santa Cruz Biotechnology). After three washes with PBS-T, filters were incubated with an α -rabbit HRP-conjugated secondary antibody (1:10,000, Jackson ImmunoResearch) for 1 hour. Detection was performed using West Dura Chemiluminescence System (Pierce). Membranes were imaged on the ChemiDoc Touch Imaging System (Bio-Rad).

***In vivo* xenograft models**

Five-week-old (20–22 g body weight) female SCID mice were obtained from Charles River animal facility. The mice were housed in sterilized filter-topped cages and maintained in a pathogen-free animal facility. Melanoma cell lines expressing netrin-1 (M2Ge, Skmel5, WM793, Skmel3, XPC, and M4Be) were implanted by subcutaneous injection of 5×10^6 cells in 100 µL of growth factor–reduced Matrigel (Corning) diluted in 100 µL of PBS into the right flank of the mice. When the tumor reached between 150 and 200 mm³, 100 mg/kg of dacarbazine was injected intraperitoneally once a week for 4 weeks and with the NET1-H-mAb every 2 days at 20 mg/kg during the 4 weeks. In addition, stable melanoma cell lines for DCC (Mewo and WM239A) were implanted by subcutaneous injection of 5×10^6 cells in 100 µL of growth factor–reduced Matrigel (Corning) diluted in 100 µL of PBS into the right flank of the mice. When tumors reached 100 mm³ in approximately 1 week after injection, 1 mg of doxycycline in 200 µL or an equal volume of PPI water for the control group was injected intraperitoneally each day for 10 days. For each xenograft experiment, tumor sizes were measured twice a week with a caliper. The tumor volume was calculated with the formula $v = 0.5 \times (l \times w^2)$, where v is volume, l is length, and w is width. All experiments were performed in accordance with relevant guidelines and regulations of animal ethics committee (Authorization no CLB-2015-004; accreditation of laboratory animal care by CECCAP, ENS Lyon-PBES).

IHC analysis of xenografted cell lines and quantification

IHC staining was performed on an automated Immunostainer (Ventana Discovery XT) using a DABmap kit and REDmap kit according to the manufacturer's instructions. Tissue samples were fixed in 10% buffered formalin and embedded in paraffin. After antigen unmasking [EDTA buffer (pH 8.4), 98°C for 35 minutes], apoptotic cell staining was performed using a rabbit cleaved caspase-3 antibody (clone 5A1E, 9664L, Cell Signaling Technology) and the rabbit cleaved Parp (clone D64E10, 6525, Cell Signaling Technology). Cell proliferation was determined using a Ki67 (clone SP6, F/RM-9106-5, Neomarkers). The slides were scanned by an Axio-Scan Zeiss microscope. Image quantification was conducted using the software Zen blue, by two blinded analyzers including a pathologist.

Generation and analysis of DCC^{mut} and tgNETRIN-1 transgenic mice in a BRAF^{CA/+} melanoma model

The DCC^{mut} model was described previously (9). For the tgNETRIN-1 mouse line (in C57BL/6 background), Human NETRIN-1 was cloned into the Rosa26-lox-stop-lox plasmid. The

mice were generated by SEAT CNRS Gustave Roussy Phenomin. These two models were intercrossed with the inducible model of predisposition to melanoma (TyrCreER^{T2}:BRAF^{CA/+}). CreER^{T2} expression and local melanomagenesis induction were activated by applying 200 µL of 2 mg/mL solution of tamoxifen (70% Z-isomer, Sigma) diluted in 100% ethanol on the back skin of 6–7 weeks old mice for 4 consecutive days. The mice were monitored twice a week for a maximum of 1 year. The mutant or wild-type animals for DCC (respectively, overexpressing netrin-1 or not) on this background BRAF^{V600E} were followed to define the impact of the abolition of apoptosis induced by receptor mutation or ligand gain on the incidence and tumor progression during animal aging. Melanoma tumors as well as different organs were recovered to carry out histologic studies and search for the presence of metastasis. All experiments were performed in accordance with relevant guidelines and regulations of animal ethics committee (Authorization no. CLB-2014-010; accreditation of laboratory animal care by CECCAPP, ENS Lyon-PBES).

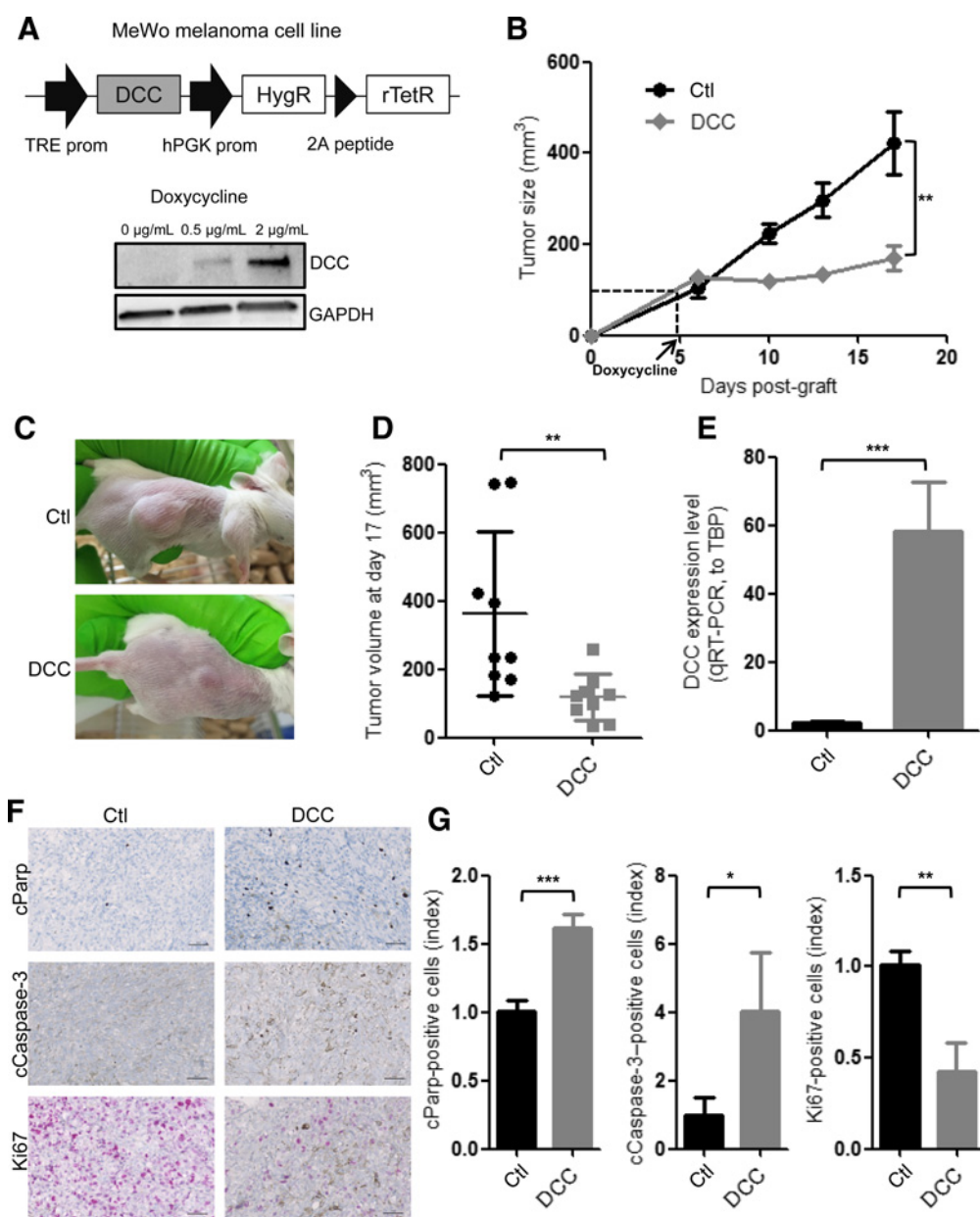
Results

DCC is a melanoma tumor suppressor

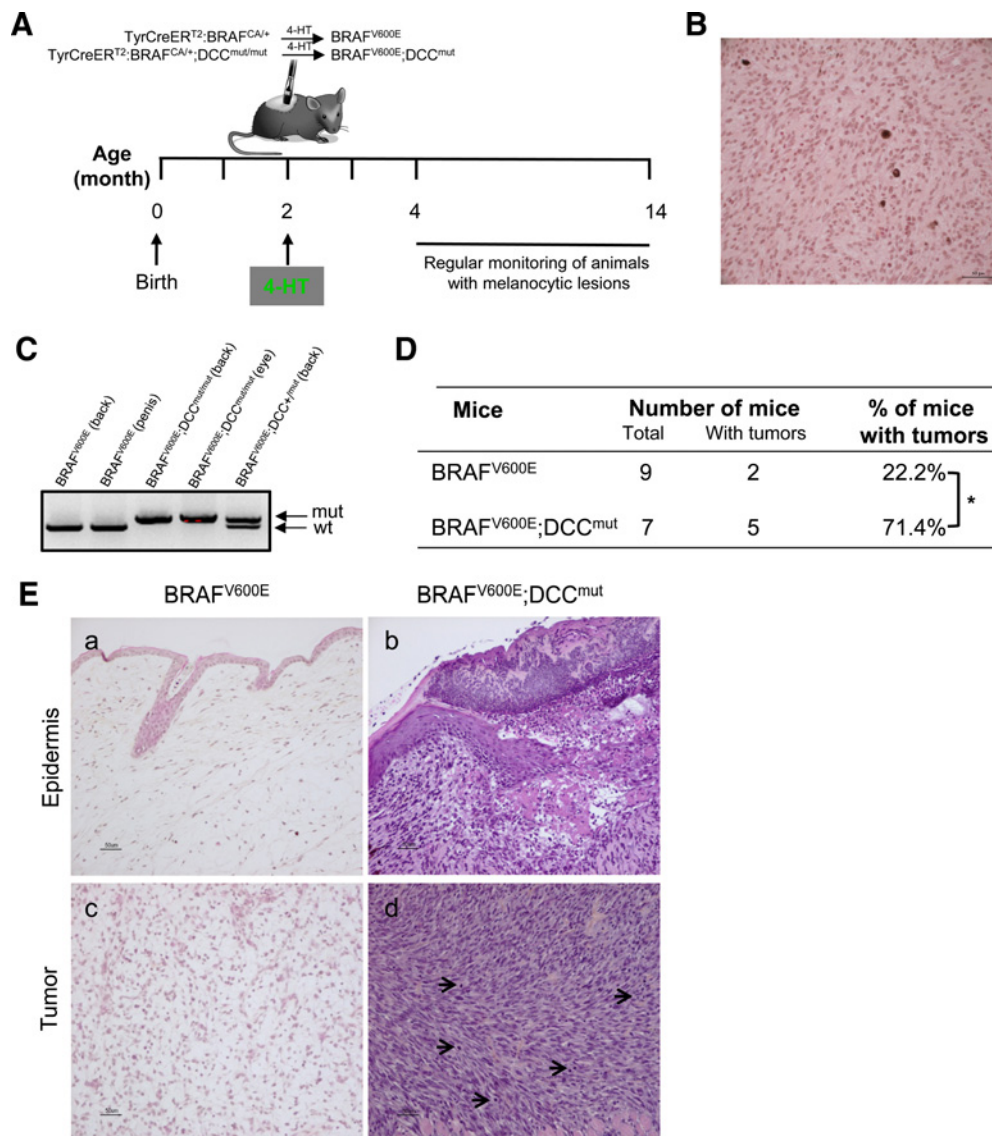
As DCC is frequently mutated in melanoma (23) or not expressed by melanoma cancer cell lines (27), we first conditionally reexpressed DCC in the amelanotic MeWo DCC-negative melanoma cell line using a sleeping beauty system (Fig. 1A). On the basis of this approach, doxycycline treatment of MeWo cells induced DCC expression (Fig. 1A). These doxycycline-dependent DCC-expressing MeWo cells were then engrafted in SCID mice, which were treated daily with doxycycline once tumors had reached 100 mm³. As shown in Fig. 1B–G, intratumoral reexpression of DCC (Fig. 1E) was associated with tumor growth inhibition (Fig. 1B–D), increased tumor cell death (cCaspase-3, cParp), and decreased cell proliferation (Ki67; Fig. 1F and G). Similar effects were observed when DCC was conditionally reexpressed in the amelanotic WM239A melanoma cell line (Supplementary Fig. S1A–S1E). Altogether, these results suggest that DCC expression is sufficient to prevent tumor growth *in vivo*.

To further demonstrate the implication of the prodeath activity of DCC in the regulation of melanoma progression, we used the recently developed DCC-mutant mouse model, in which the endogenous DCC gene locus is point mutated to convert Asp1290 into Asn1290 to specifically inactivate the prodeath activity of DCC, hereinafter referred to as DCC^{mut} (9, 10). It has been shown that in this mouse model, the positive signaling induced by netrin-1 binding to DCC is not affected, while DCC is unable to trigger cell death (9). We intercrossed mice harboring two DCC^{mut} alleles with the classical murine melanoma model TyrCreER^{T2}:BRAF^{CA/+} (28, 29), as almost 60% of human melanomas show somatic mutations that constitutively activate serine/threonine-protein kinase BRAF (BRAF^{V600E}). The TyrCreER^{T2}:BRAF^{CA/+} murine model, which conditionally expresses the dominant oncogenic form BRAF^{V600E} of the BRAF protein, was shown to be prone to develop melanoma neoplasia during ageing (28). TyrCreER^{T2}:BRAF^{CA/+} and TyrCreER^{T2}:BRAF^{CA/+}; DCC^{mut/mut} mice were then treated with tamoxifen and are hereafter referred to as BRAF^{V600E} and BRAF^{V600E};DCC^{mut}, respectively (Fig. 2A). Melanoma development was monitored up to 12 months after tamoxifen skin treatment. Upon treatment with tamoxifen, around 20% of the BRAF^{V600E} mice developed cutaneous lesions identified as melanoma by pathologists (Fig. 2B–D; Supplementary Fig. S2). Remarkably and as shown in Fig. 2D, DCC mutation, confirmed at different tumor locations (Fig. 2C), was associated with a significantly increased propensity to develop melanoma, because

Boussouar et al.

**Figure 1.**

DCC behaves as a tumor suppressor in melanoma. **A**, Schematic diagram of the DCC-inducible construct. Expression of DCC is controlled by the reverse tetracycline-controlled transactivator (rTetR), which activates the TRE promoter in the presence of doxycycline. Infected cells are selected by hygromycin (HygR). rTetR and hygromycin are under the control of a ubiquitous hPGK promoter and the cleavage between the two proteins is ensured by a 2A peptide. Below, stable melanoma cell lines for DCC (amelanotic MeWo) were treated with 0.5 and 2 $\mu\text{g/mL}$ of doxycycline for 24 hours and DCC protein levels were evaluated by Western blot analysis. DCC protein, normalized against GAPDH, increased strongly following doxycycline treatment. **B**, SCID mice were engrafted with stable melanoma cell lines containing the DCC construct (amelanotic MeWo) by subcutaneous injection. When tumor size reached around 100 mm³, expression of DCC was induced by daily intraperitoneal injection of doxycycline ($n = 9$); the control (ctl) group was treated with PPI water ($n = 9$). Results are presented as mean tumor volumes. Two-way ANOVA: time and interaction, ****, $P < 10^{-4}$, not shown; cell type, **, $P = 0.0015$. **C**, Photograph of tumor-bearing shaved mice. **D**, Tumor volumes were measured at day 17 (end of the experiment) after sacrifice of mice and taking only the size of tumors without skin. **, $P = 0.0094$, two-tailed unpaired t test. **E**, Expression of DCC was confirmed by qRT-PCR, relatively to the TBP housekeeping gene, in tumors from a group of mice treated with doxycycline, whereas no expression was detected in control group. ****, $P = 0.0003$, two-tailed unpaired t test. **F**, IHC staining of cleaved PARP, activated caspase-3, and Ki67 performed on tumor sections from a group of mice treated with doxycycline compared with control group. Scale bars, 50 μm . **G**, Relative levels corresponding to **F**. *, $P = 0.04$; **, $P = 0.0014$; ****, $P = 0.0002$; two-tailed unpaired t test.

**Figure 2.**

Inactivation of DCC-induced apoptosis favors melanoma formation in a BRAF^{V600E} background. **A**, Strategy used to generate BRAF^{V600E} and BRAF^{V600E};DCC^{mut} mice. The mice were monitored twice a week for a maximum of 1 year. **B**, Histological analysis of tumors shows that the mice developed cutaneous lesions that were categorized as melanoma by pathologists. Dark granulations could be seen in the cytoplasm of some tumor cells. Scale bar, 50 μ m. **C**, Mutation of DCC was confirmed by PCR on tumors at different anatomic locations (back, eye, penis, etc.). **D**, Incidence and frequency of melanoma in BRAF^{V600E};DCC^{mut} mice ($n = 7$) compared with BRAF^{V600E} mice ($n = 9$; *, $P = 0.04$; Fisher test). Tumor classification was performed, blinded to genotype according to pathologist's consensus. **E**, Cutaneous melanomas in BRAF^{V600E} control mice (**a** and **c**) and BRAF^{V600E};DCC^{mut} mice (**b** and **d**), hematoxylin and eosin staining. **a** and **b**, The overlying epidermis almost normal in BRAF^{V600E} mice, whereas in BRAF^{V600E};DCC^{mut}, epidermis was thickened (acanthosis) and ulcerated. **c** and **d**, High-power magnification of malignant melanoma. **c**, Melanomas in BRAF^{V600E} mice were hypomelanotic, with plump to spindle neoplastic cells, arranged mostly in short bundles, within a myxoid matrix. **d**, In BRAF^{V600E};DCC^{mut} mice, cellularity within the tumor was increased, with a denser collagenous stroma. Arrows, mitoses were more frequent per high power field. Scale bar, 50 μ m. mut, mutant; wt, wild-type.

71.4% of BRAF^{V600E};DCC^{mut} mice developed melanoma lesions within the first 12 months of tamoxifen application (Fig. 2D). This increase in propensity to develop melanoma was moreover associated in 60% of these mice (Supplementary Table S1), with histologic features associated with increased aggressiveness, including increased cellularity within the tumor together with more frequent mitoses, a denser collagenous stroma (Fig. 2E, c and d), and acanthosis and ulceration of the overlying epidermis (Fig. 2E, a and b). A detailed pathology report is presented in Supplementary Table S2 for each BRAF^{V600E};

DCC^{mut} tumors. Collectively these results demonstrate that DCC constitutes a constraint for melanoma development through its pro-death activity.

Upregulation of netrin-1 promotes melanoma development

Having shown that reexpression of DCC is associated with tumor growth inhibition and that mutation of the death activity of DCC is associated with melanoma progression, we hypothesized that in the human pathology, the progressing melanoma should have negatively

Boussouar et al.

selected DCC-induced cell death. One mechanism to silence DCC-induced tumor cell death is the upregulation of netrin-1 (10). We thus analyzed netrin-1 expression by IHC on a panel of melanoma, benign nevus, or of lymph node metastasis. As shown in Fig. 3A–C; Supplementary Table S3, a netrin-1-specific staining is clearly visible in melanoma and metastatic lesions, and was seen in microvascular endothelial cells (black arrows) and in tumor cells. When defining a score for the fraction of cancer cells expressing netrin-1, a high score (75%–100%) was mostly detected in malignant melanoma (Fig. 3B) compared with benign melanocytic lesions, and this trend toward an increase in netrin-1 expression associated with progression was further observed when melanoma with metastasis at time of study was compared with melanoma without metastasis at time of

study (Supplementary Fig. S3A). Similar observations were made when the intensity of the netrin-1 signal in cancer cells was analyzed (Fig. 3C; Supplementary Fig. S3B; Supplementary Table S4). These data thus support the view that netrin-1 is upregulated in aggressive melanoma in the human pathology.

Next, we investigated whether forced expression of netrin-1 in the skin of mice was associated with increased melanoma progression. To address this, we generated a mouse model (tgNETRIN-1) in which a loxP-stop-loxP-human netrin-1 cassette was inserted in the endogenous Rosa26 locus. Ectopic netrin-1 expression could then be triggered by Cre recombination (Fig. 4A, top). We intercrossed tgNETRIN-1 mice with TyrCreER^{T2}:BRAF^{CA/+} mice (hereinafter referred to as TyrCreER^{T2}:BRAF^{CA/+};tgNETRIN-1), and cutaneously

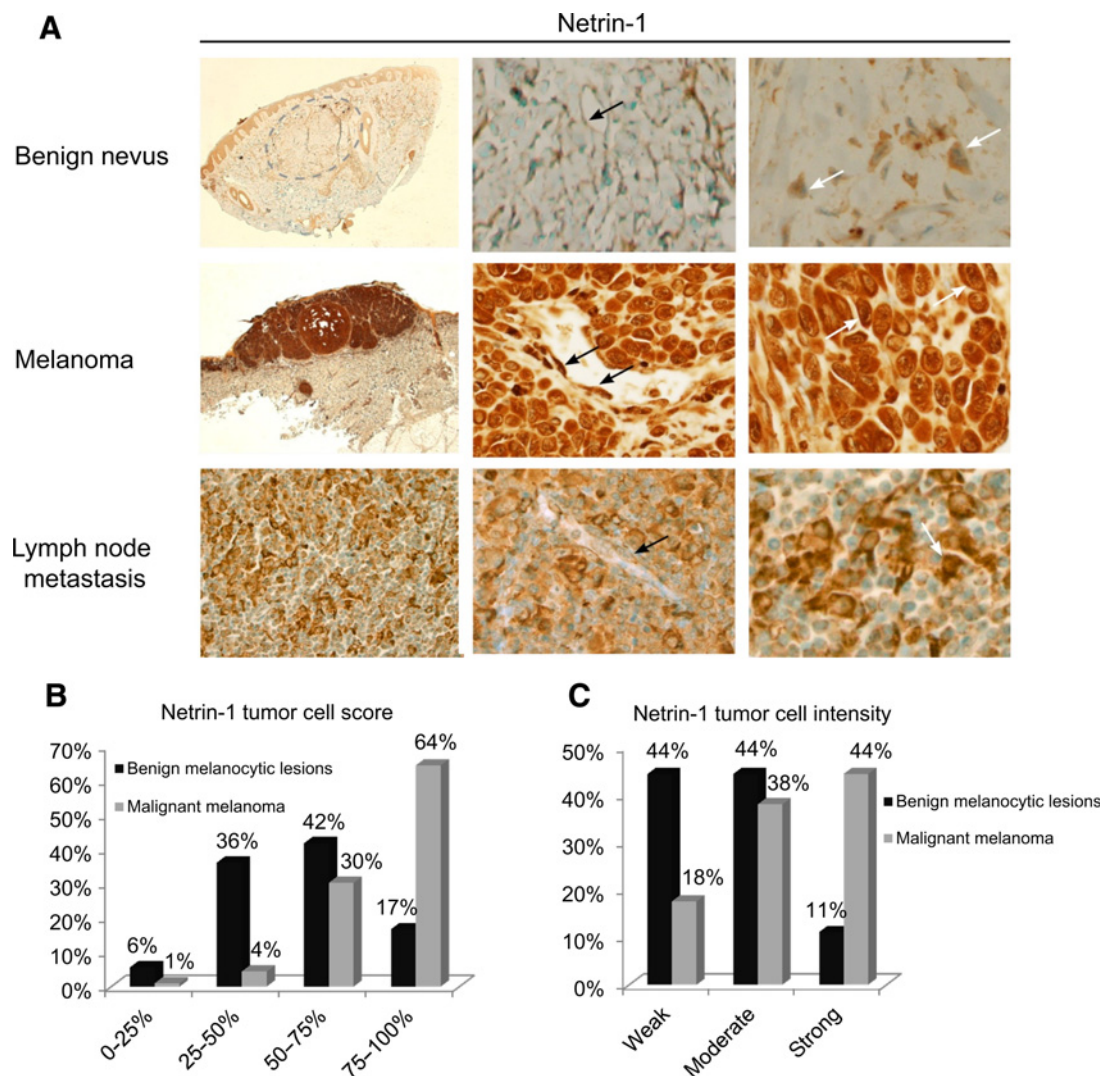
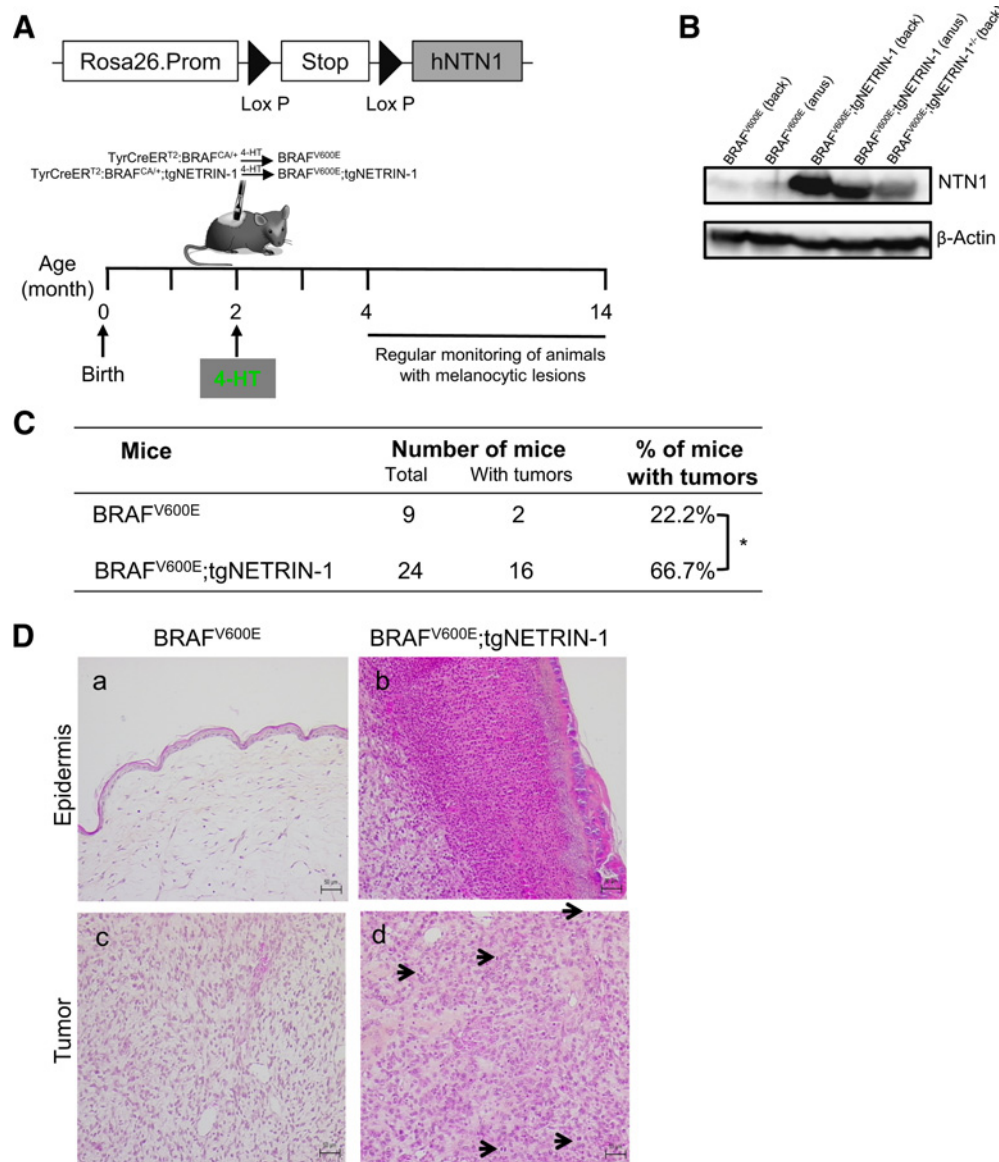


Figure 3.

Netrin-1 expression is higher in the advanced stages of melanoma. **A**, Panel displaying representative IHC images used to analyze netrin-1 expression on tissue sections. In a benign nevus (area within broken lines), netrin-1 was not expressed. In microvascular endothelial cells (black arrow) and nevus cells (white arrows), netrin-1 staining was cytoplasmic but not nuclear. In a melanoma Breslow index, 3 mm netrin-1 was strongly expressed in microvascular endothelial cells (black arrows) and in tumor cells. Some tumor cells (white arrows) have cytoplasmic and nuclear staining. In a lymph node metastasis, netrin-1 was strongly expressed in tumor cells scattered among lymphocytic cells. It is not expressed on lymph node microvascular endothelial cells (black arrow). At a higher magnification ($\times 400$), few tumor cells expressed netrin-1 on nuclear and cytoplasmic areas (white arrow). **B** and **C**, Histograms describe the scores and tumor intensity of netrin-1 in benign melanocytic lesions versus malignant melanoma. The analysis shows a correlation between the levels of netrin-1 (intensity or score) and the level of malignancy of the nevi.

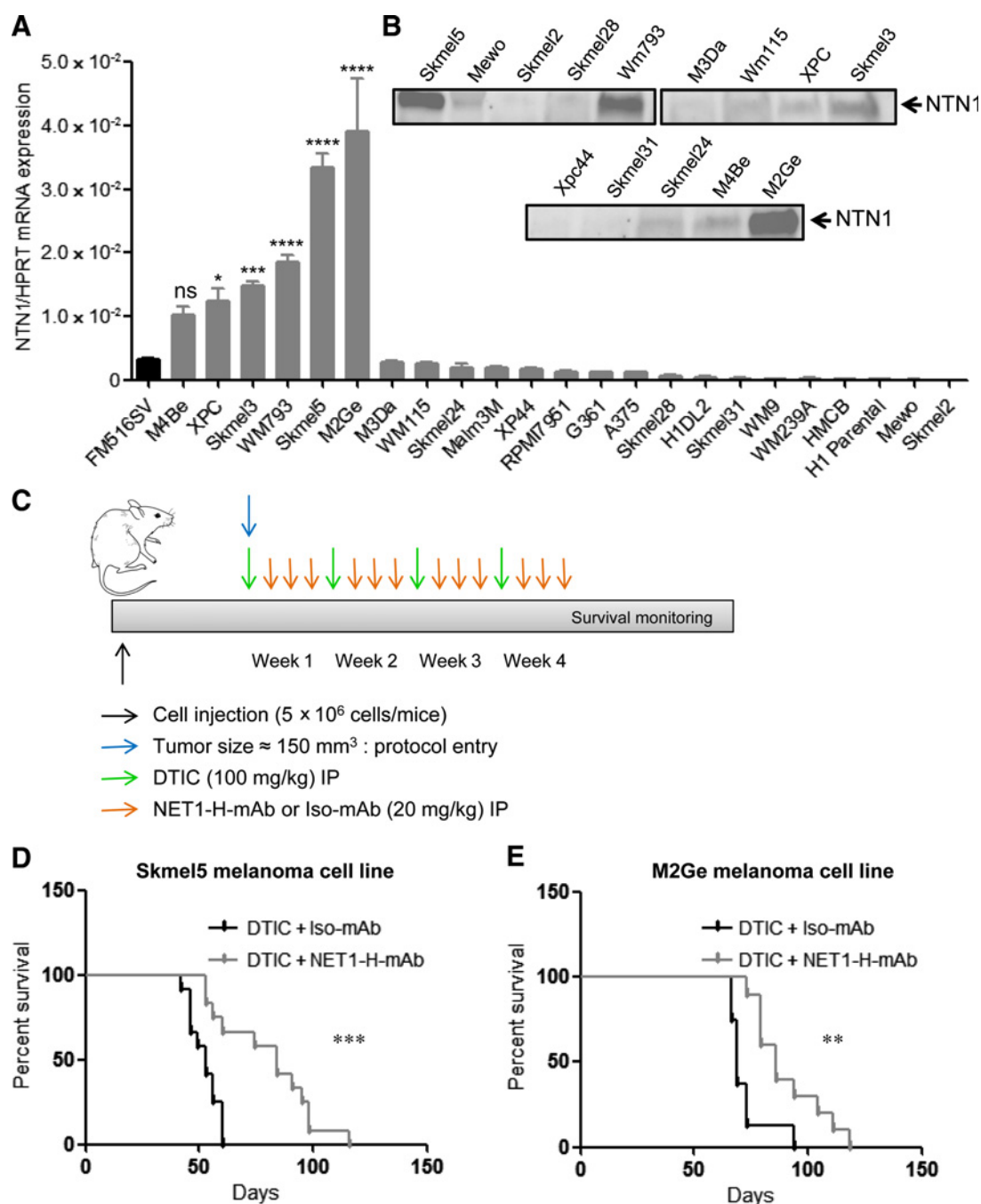
**Figure 4.**

Netrin-1 overexpression favors melanoma formation in a BRAF^{V600E} background. **A**, Strategy used to generate BRAF^{V600E} and BRAF^{V600E};tgNETRIN-1 mice. Schematic diagram of the netrin-1 (NTN1) conditional overexpression construct (top). The expression of the human *netrin-1* gene was placed under the endogenous promoter activity of the Rosa26 locus and was induced after the excision of the lox-stop-lox cassette by a specific Cre. Mice were crossed with TyrCreER mice with melanocyte-specific expression of a hormone-dependent form of Cre recombinase (CreER^{T2}; bottom). Tamoxifen-dependent activation of CreER leads to melanocyte-specific conversion of BRAF^{V600E} and NTN1 overexpression. The mice were monitored twice a week for a maximum of 1 year. **B**, NTN1 protein levels in tumors (melanoma) were evaluated by Western blot analysis. NTN1 protein, normalized against β -actin, expression was higher in homozygous mice compared with heterozygous and wild-type (wt) mice. **C**, Incidence and frequency of melanoma in BRAF^{V600E};tgNETRIN-1 mice ($n = 24$) compared with BRAF^{V600E} mice ($n = 9$; *, $P = 0.02$, Fisher test). Tumor classification was performed blinded to genotype according to pathologist's consensus. **D**, Cutaneous melanomas in BRAF^{V600E} mice (**a** and **c**) and BRAF^{V600E};tgNETRIN-1 mice (**b** and **d**), hematoxylin and eosin staining. **a** and **b**, The overlying epidermis was almost normal in BRAF^{V600E} mice, whereas in BRAF^{V600E};tgNETRIN-1 mice, epidermis was thickened (acanthosis) and ulcerated, with subsequent neutrophilic and suppurative inflammation. **c** and **d**, High-power magnification of malignant melanoma. **c**, Melanomas in BRAF^{V600E} were hypomelanotic, with plump to spindle neoplastic cells, arranged mostly in short bundles within a myxoid matrix. **d**, In BRAF^{V600E};tgNETRIN-1 mice, cellularity within the tumor was increased, with frequent mitoses per high power field (arrows). Scale bar, 50 μ m.

treated TyrCreER^{T2}:BRAF^{CA/+} and TyrCreER^{T2}:BRAF^{CA/+};tgNETRIN-1 mice with tamoxifen, hereafter referred to as BRAF^{V600E} and BRAF^{V600E};tgNETRIN-1, respectively (Fig. 4A and B). As shown in Fig. 4C, forced expression of netrin-1 in BRAF^{V600E};tgNETRIN-1 mice was associated with a drastic increase in the frequency of primary

melanoma compared with BRAF^{V600E} mice. No metastases were observed at necropsy. This increase propensity to develop melanoma was associated in 43.75% of these mice (Supplementary Table S5), with increase in aggressiveness markers, such as cellularity and a higher number of mitoses per high power field within the tumor (Fig. 4D,

Boussouar et al.

**Figure 5.**

Combining netrin-1 interference with conventional chemotherapy (dacarbazine) enhances overall mouse survival. **A**, Analysis of netrin-1 expression in a cohort of 23 melanoma cell lines compared with the nontransformed immortal human melanocyte cell line FM516SV. Quantification of gene expression was performed by qRT-PCR, relative to the *HPRT* housekeeping gene. *, $P = 0.0142$; ***, $P = 0.0008$; ****, $P < 10^{-4}$; one-way ANOVA, followed by Dunnett multiple comparison test. ns, nonsignificant. **B**, Expression of netrin-1 was confirmed by Western blot analysis on M4Be, XPC, Skmel3, WM793, Skmel5, and M2Ge melanoma cell line. **C**, Schematic representation of treatment schedules of mice with preestablished (Skmel5 and M2Ge) subcutaneous tumors. When the tumor reached between 150 and 200 mm^3 , mice were treated once a week with dacarbazine (DTIC) for 4 weeks by intraperitoneal (IP) injection at 100 mg/kg and with the NTN1-H-mAb every 2 days at 20 mg/kg during the 4 weeks. In the control group, dacarbazine was combined with the Iso-mAb. Tumor volumes were measured twice a week with a caliper. **D**, Survival curve comparison between the group of mice treated with dacarbazine + NTN1-H-mAb ($n = 12$) and the one treated with dacarbazine + Iso-mAb ($n = 12$), in mice xenografted with amelanotic Skmel5 melanoma cell line. ***, $P = 0.0004$; statistical significance of differences between both groups was determined by Mantel-Cox test. **E**, Survival curve comparison between the group of mice treated with dacarbazine + NTN1-H-mAb ($n = 10$) and the one treated with dacarbazine + Iso-mAb ($n = 8$), in mice xenografted with melanotic M2Ge melanoma cell line. **, $P = 0.0015$; statistical significance of differences between both groups was determined by Wilcoxon test.

c and d). In addition, the skin of 50% of these mice was thickened (acanthosis) and ulcerated (Fig. 4D, a and b). A detailed pathology report is presented in Supplementary Table S6 for each BRAF^{V600E}; tgNETRIN-1 tumors. In-line with the proposed mechanisms, when analyzing cell death in the corresponding tumors using active caspase-3 staining, we observed that tumors from the BRAF/tg-netrin-1 background displayed fewer apoptotic cells compared with the BRAF background (Supplementary Fig. S4A and S4B). Taken together, these data demonstrate that the netrin-1 overexpression seen in human melanoma is sufficient *per se* to trigger melanoma progression in mice.

Combining netrin-1 interference with a conventional treatment is associated with increased overall mouse survival

Because the above data were showing that netrin-1 is causally implicated in melanoma progression and because a therapeutic anti-netrin-1 mAb is currently tested in early clinical trial, we investigated whether in melanoma preclinical models we could detect a tumor growth inhibiting effect of the anti-netrin-1 mAb. We first screened for netrin-1 expression in a panel of melanoma cell lines (general information on the genotype of these cell lines is well detailed in Supplementary Table S7). In agreement with the netrin-1 staining observed in human melanoma, a sizeable fraction of melanoma cell lines expressed netrin-1 both at the mRNA (Fig. 5A) and protein levels (Fig. 5B). Skmel5 and M2Ge were further studied as they displayed the strongest netrin-1 expression. These cells were engrafted into immune-deficient mice, which were systemically treated with either the netrin-1 mAb alone (monotherapy) or in combination with dacarbazine once tumors reached 150 mm³, and the overall survival of mice was followed (Fig. 5C). The netrin-1 mAb was only modestly affecting tumor growth when used alone in agreement with what was previously reported in highly proliferative models (Supplementary Fig. S5A; refs. 20, 30). However, when combined with dacarbazine, the netrin-1 mAb significantly increased overall mouse survival in several models including Skmel5-engrafted and M2Ge-engrafted mice (Fig. 5D and E; Supplementary Fig. S5B and S5C). Overall, these data support the hypothesis that targeting netrin-1 in netrin-1-expressing melanoma could constitute a complementary therapeutic strategy to conventional treatments.

Discussion

While debates on the role of DCC as a tumor suppressor somehow dampened the interest of scientists for studying DCC in the field of oncology (3, 31), the demonstration that the conditional deletion of DCC in mice was associated with increased metastasis in p53-deficient mammary tumors (5) and that the silencing of DCC death activity was associated with intestinal cancer progression (9) and increased lymphoma development (10), has strengthened the view that DCC is constraining tumor progression by engaging cell death. Consistently, Halaban and colleagues elegantly established that DCC is the third most frequently mutated gene in sun-exposed melanoma, suggesting that DCC may also be a tumor suppressor in melanoma (23). Furthermore, DCC was also found as one of the genes identified as mutated in both cutaneous malignant melanoma and Parkinson disease (32). We provide here evidence that DCC expression is a constraint for melanoma cell growth in engrafted mice and we demonstrate that the silencing of the death activity of DCC in murine skin cells is associated with increased melanoma development in BRAF-mutant settings. Thus, even though it remains to be shown whether the mutations of DCC detected in human melanoma are loss-

of-proapoptotic function mutations, the data obtained here and the frequency of DCC mutation strongly supports the view that DCC is a tumor suppressor in melanoma.

According to the dependence receptor hypothesis, cancer cells have to silence DCC-induced cell death to survive (7, 8) and this can be achieved through at least two mechanisms, the first being the silencing of the receptor or of the receptor prodeath activity by for example mutation as extensively described for DCC in colorectal cancer (9). The second known mechanism is the autocrine/paracrine expression of the ligand, in our case, netrin-1. Along this line it has been shown that netrin-1 is upregulated in a fraction of various cancers (10, 17, 18, 33) and that interference with netrin-1/netrin-1 receptor interaction is associated with tumor growth inhibition in several preclinical models (10, 18, 33, 34). We show that a similar mechanism occurs in melanoma, in which netrin-1 expression is detected both in a fraction of human melanoma cell lines and in a fraction of human melanoma samples. We also show that this netrin-1 expression promotes melanoma development in mice in a BRAF-mutant background. Of interest, an anti-netrin-1 mAb is currently in phase I of a clinical trial assessing all solid tumors (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02977195>) with reported signs of clinical efficacy (22), and we present evidence that in preclinical models, combining the netrin-1 mAb and dacarbazine enhances animal survival. Future work should also investigate whether combining netrin-1 interference with novel drugs, such as immune checkpoint inhibitors, recently developed and/or approved in the melanoma indication are also biologically relevant and deserve to be assessed in clinical combination trials.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

M. Battistella has received speakers bureau honoraria from Bristol Myers Squibb. C. Lebbé reports receiving a commercial research grant from BMS and Roche, has received speakers bureau honoraria from BMS, MSD, Novartis, Amgen, and Roche, and has provided expert testimony for BMS, MSD, Novartis, Amgen, Roche, Avantis, Pierre-Fabre, Pfizer, and Incyte. P. Mehlen is an interim CEO (paid consultant) for Netris Pharma and has ownership interest (including patents) in Netris Pharma. No potential conflicts of interest were disclosed by the other authors.

Authors' Contributions

Conception and design: A. Boussouar, L. Larue, P. Mehlen

Development of methodology: A. Boussouar, N. Gadot, L. Larue

Acquisition of data (provided animals, acquired and managed patients, provided facilities, etc.): A. Boussouar, A. Manceau, A. Paradisi, N. Gadot, J. Vial, L. Larue, M. Battistella, C. Leboeuf, C. Lebbé, A. Janin

Analysis and interpretation of data (e.g., statistical analysis, biostatistics, computational analysis): A. Boussouar, A. Tortoreau, A. Paradisi, M. Battistella, C. Lebbé, A. Janin

Writing, review, and/or revision of the manuscript: A. Boussouar, M. Battistella, C. Lebbé, A. Janin, P. Mehlen

Administrative, technical, or material support (i.e., reporting or organizing data, constructing databases): A. Boussouar, D. Neves, P. Mehlen

Study supervision: A. Boussouar, P. Mehlen

Acknowledgments

We wish to thank Julie Caramel, Stéphane Dalle, and Thibault Voeltzel for materials and scientific advises. This work was supported by institutional grants from CNRS, University of Lyon, Centre Léon Bérard, and from the Ligue Contre le Cancer, INCA, Pair Melanoma, ANR, and ERC.

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

Received May 23, 2018; revised October 25, 2019; accepted December 2, 2019; published first December 5, 2019.

Boussouar et al.

References

- Mehlen P, Fearon ER. Role of the dependence receptor DCC in colorectal cancer pathogenesis. *J Clin Oncol* 2004;22:3420–8.
- Takaku K, Oshima M, Miyoshi H, Matsui M, Seldin MF, Taketo MM. Intestinal tumorigenesis in compound mutant mice of both *Dpc4* (*Smad4*) and *Apc* genes. *Cell* 1998;92:645–56.
- Fazeli A, Dickinson SL, Hermiston ML, Tighe RV, Steen RG, Small CG, et al. Phenotype of mice lacking functional deleted in colorectal cancer (DCC) gene. *Nature* 1997;386:796–804.
- Roush W. Putative cancer gene shows up in development instead. *Science* 1997;276:534–5.
- Krimpenfort P, Song JY, Proost N, Zevenhoven J, Jonkers J, Berns A. Deleted in colorectal carcinoma suppresses metastasis in p53-deficient mammary tumours. *Nature* 2012;482:538–41.
- Mehlen P, Rabizadeh S, Snipas SJ, Assa-Munt N, Salvesen GS, Bredesen DE. The DCC gene product induces apoptosis by a mechanism requiring receptor proteolysis. *Nature* 1998;395:801–4.
- Goldschneider D, Mehlen P. Dependence receptors: a new paradigm in cell signaling and cancer therapy. *Oncogene* 2010;29:1865–82.
- Gibert B, Mehlen P. Dependence receptors and cancer: addiction to Trophic ligands. *Cancer Res* 2015;75:5171–5.
- Castets M, Broutier L, Molin Y, Brevet M, Chazot G, Gadot N, et al. DCC constrains tumour progression via its dependence receptor activity. *Nature* 2011;482:534–7.
- Broutier L, Creveaux M, Vial J, Tortoreau A, Delcros JG, Chazot G, et al. Targeting netrin-1/DCC interaction in diffuse large B-cell and mantle cell lymphomas. *EMBO Mol Med* 2016;8:96–104.
- Wu Z, Makihara S, Yam PT, Teo S, Renier N, Balekoglou N, et al. Long-range guidance of spinal commissural axons by netrin1 and sonic hedgehog from midline floor plate cells. *Neuron* 2019;101:635–47.
- Serafini T, Kennedy TE, Galko MJ, Mirzayan C, Jessell TM, Tessier-Lavigne M. The netrins define a family of axon outgrowth-promoting proteins homologous to *C. elegans* UNC-6. *Cell* 1994;78:409–24.
- Dominici C, Moreno-Bravo JA, Puiggros SR, Rappeneau Q, Rama N, Vieugue P, et al. Floor-plate-derived netrin-1 is dispensable for commissural axon guidance. *Nature* 2017;545:350–4.
- Moreno-Bravo JA, Roig Puiggros S, Mehlen P, Chedotal A. Synergistic activity of floor-plate- and ventricular-zone-derived netrin-1 in spinal cord commissural axon guidance. *Neuron* 2019;101:625–34.e3.
- Mehlen P, Delloye-Bourgeois C, Chedotal A. Novel roles for Slits and netrins: axon guidance cues as anticancer targets? *Nat Rev Cancer* 2011;11:188–97.
- Harter PN, Zinke J, Scholz A, Tichy J, Zachskorn C, Kvasnicka HM, et al. Netrin-1 expression is an independent prognostic factor for poor patient survival in brain metastases. *PLoS One* 2014;9:e92311.
- Dumartin L, Quemener C, Laklai H, Herbert J, Bicknell R, Bousquet C, et al. Netrin-1 mediates early events in pancreatic adenocarcinoma progression, acting on tumor and endothelial cells. *Gastroenterology* 2010;138:1595–606.
- Fitamant J, Guenebeaud C, Coissieux MM, Guix C, Treilleux I, Scoazec JY, et al. Netrin-1 expression confers a selective advantage for tumor cell survival in metastatic breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:4850–5.
- Sung PJ, Rama N, Imbach J, Fiore S, Ducarouge B, Neves D, et al. Cancer-associated fibroblasts produce netrin-1 to control cancer cell plasticity. *Cancer Res* 2019;79:3651–61.
- Grandin M, Mathot P, Devailly G, Bidet Y, Ghantous A, Favrot C, et al. Inhibition of DNA methylation promotes breast tumor sensitivity to netrin-1 interference. *EMBO Mol Med* 2016;8:863–77.
- Paradisi A, Creveaux M, Gibert B, Devailly G, Redoulez E, Neves D, et al. Combining chemotherapeutic agents and netrin-1 interference potentiates cancer cell death. *EMBO Mol Med* 2013;5:1821–34.
- Cassier P, Eberst L, Garin G, Courbebaisse Y, Terret C, Robert M, et al. A first in human, phase 1 trial of NP137, a first-in-class antibody targeting netrin-1, in patients with advanced refractory solid tumors. *Ann Oncol* 2019;30 (suppl_5):v159–v193. DOI: 10.1093/annonc/mdz244.
- Krauthammer M, Kong Y, Ha BH, Evans P, Bacchiocchi A, McCusker JP, et al. Exome sequencing identifies recurrent somatic RAC1 mutations in melanoma. *Nat Genet* 2012;44:1006–14.
- Arbiser JL, Bonner MY, Gilbert LC. Targeting the duality of cancer. *NPJ Precis Oncol* 2017;1:pii: 23.
- Pietrobono S, Morandi A, Gagliardi S, Gerlini G, Borgognoni L, Chiarugi P, et al. Down-regulation of SOX2 underlies the inhibitory effects of the triphenylmethane gentian violet on melanoma cell self-renewal and survival. *J Invest Dermatol* 2016;136:2059–69.
- Slominski AT, Carlson JA. Melanoma resistance: a bright future for academicians and a challenge for patient advocates. *Mayo Clin Proc* 2014;89:429–33.
- Kaufmann S, Kuphal S, Schubert T, Bosserhoff AK. Functional implication of Netrin expression in malignant melanoma. *Cell Oncol* 2009;31:415–22.
- Dhomen N, Reis-Filho JS, da Rocha Dias S, Hayward R, Savage K, Delmas V, et al. Oncogenic Braf induces melanocyte senescence and melanoma in mice. *Cancer Cell* 2009;15:294–303.
- Yajima I, Belloir E, Bourgeois Y, Kumasaka M, Delmas V, Larue L. Spatiotemporal gene control by the Cre-ERT2 system in melanocytes. *Genesis* 2006;44:34–43.
- Grandin M, Meier M, Delcros JG, Nikodemus D, Reuten R, Patel TR, et al. Structural decoding of the netrin-1/UNC5 interaction and its therapeutical implications in cancers. *Cancer Cell* 2016;29:173–85.
- Fearon ER. DCC: is there a connection between tumorigenesis and cell guidance molecules? *Biochim Biophys Acta* 1996;1288:M17–23.
- Lubbe SJ, Escott-Price V, Brice A, Gasser T, Pittman AM, Bras J, et al. Rare variants analysis of cutaneous malignant melanoma genes in Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 2016;48:222.
- Delloye-Bourgeois C, Brambilla E, Coissieux MM, Guenebeaud C, Pedoux R, Firlje V, et al. Interference with netrin-1 and tumor cell death in non-small cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 2009;101:237–47.
- Delloye-Bourgeois C, Fitamant J, Paradisi A, Cappellen D, Douc-Rasy S, Raquin MA, et al. Netrin-1 acts as a survival factor for aggressive neuroblastoma. *J Exp Med* 2009;206:833–47.

Cancer Research

The Journal of Cancer Research (1916–1930) | The American Journal of Cancer (1931–1940)

Netrin-1 and Its Receptor DCC Are Causally Implicated in Melanoma Progression

Amina Boussouar, Antonin Tortereau, Ambroise Manceau, et al.

Cancer Res 2020;80:747-756. Published OnlineFirst December 5, 2019.

Updated version Access the most recent version of this article at:
doi:[10.1158/0008-5472.CAN-18-1590](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-1590)

Supplementary Material Access the most recent supplemental material at:
<http://cancerres.aacrjournals.org/content/suppl/2019/12/05/0008-5472.CAN-18-1590.DC1>

Cited articles This article cites 34 articles, 8 of which you can access for free at:
<http://cancerres.aacrjournals.org/content/80/4/747.full#ref-list-1>

E-mail alerts [Sign up to receive free email-alerts](#) related to this article or journal.

Reprints and Subscriptions To order reprints of this article or to subscribe to the journal, contact the AACR Publications Department at pubs@aacr.org.

Permissions To request permission to re-use all or part of this article, use this link
<http://cancerres.aacrjournals.org/content/80/4/747>.
Click on "Request Permissions" which will take you to the Copyright Clearance Center's (CCC) Rightslink site.

ANNEXE 2

Δ 40p53 isoform regulates netrin-1 and its dependence receptor UNC5B gene expression, enhancing tumour cell survival

Running title: Regulation of netrin-1 expression by Δ 40p53

En soumission

Yan Sun¹, Ambroise Manceau^{1*}, Lucie Cappuccio^{2*}, Valeria Basso¹, Hong Wang¹, Carine Maisse², Patrick Mehlen^{1§}, and Andrea Paradisi^{1§}

¹Apoptosis, Cancer and Development Laboratory - Equipe labellisée ‘La Ligue’, LabEx DEVweCAN, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, INSERM U1052-CNRS UMR5286, Université de Lyon, Université Claude Bernard Lyon1, Centre Léon Bérard, 69008 Lyon, France.
²IVPC UMR754 INRA, Université de Lyon, Université Claude Bernard Lyon1, EPHE, Lyon, France.

*These authors contributed equally to this work

§Co-senior and Corresponding authors: andrea.paradisi@lyon.unicancer.fr or patrick.mehlen@lyon.unicancer.fr.

ANNEXE 3

Targeting netrin-3 in Small Cell Lung Cancer and Neuroblastoma.

EMBO molecular medicine, en révision

Shan Jiang^{1*}, Mathieu Richaud^{1*}, Pauline Vieugué^{1*}, Nicolas Rama¹, Jean Guy Delcros^{1,2}, Maha Siouda³, Mitsuaki Sanada⁴, Anna-Rita Redavid¹, Benjamin Ducarouge⁵, Silvia Breusa¹, Maeva Hervieu¹, Ambroise Manceau¹, Charles-Henry Gattolliat⁶, Nicolas Gadot⁷, Valérie Combaret⁷, David Neves⁵, Sandra Ortiz-Cuaran³, Pierre Saintigny³, Olivier Meurette¹, Thomas Walter^{1,9}, Isabelle Janoueix-Lerosey⁹, Paul Hofman¹⁰, Peter Mulligan³, David Goldshneider⁵, Patrick Mehlen^{1§} and Benjamin Gibert^{1§}.

¹ Apoptosis, Cancer and Development Laboratory- Equipe labellisée ‘La Ligue’, LabEx DEVweCAN, Institut PLAsCAN, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, INSERM U1052-CNRS UMR5286, Université de Lyon, Centre Léon Bérard, 69008 Lyon, France.

² Small molecules for biological targets, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon. UMR INSERM 1052 – CNRS 5286 ISPB Rockefeller. 69008 Lyon, France.

³ Univ Lyon, Centre Léon Bérard, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, INSERM 1052, CNRS 5286, Lyon, France.

⁴ Toray Industries, Inc., New Frontiers Research Labs, Kanagawa 248-8555, Japan.

⁵ Netris Pharma, Lyon, France.

⁶ CNRS UMR 8126, University Paris-Sud 11, Institut Gustave Roussy, 114 rue Edouard, Villejuif F-94805, France.

⁷ Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, Centre Léon Bérard, Lyon, France.

⁸ Hospices Civils de Lyon, Hôpital Edouard Herriot, Service de Gastroentérologie et d’Oncologie Digestive, 69437 Lyon cedex 03, France.

⁹ INSERM, U830, Génétique et Biologie des Cancers, Institut Curie, Paris, France. ¹⁰ Laboratory of Clinical and Experimental Pathology, Université Côte d’Azur, CHU Nice, FHU OncoAge, Pasteur Hospital, Nice, France.

[§]Co-last authors and corresponding authors: P. Mehlen; e-mail: patrick.mehlen@lyon.unicancer.fr and B. Gibert e-mail: benjamin.gibert@lyon.unicancer.fr

* These authors equally contribute to the work

Appartenant à la famille des récepteurs à dépendance, UNC5B est capable d'induire deux signalisations opposées : en présence de son ligand, la nétrine 1, il induit une signalisation de survie cellulaire, de différenciation ou migration, alors qu'en absence du ligand il induit activement une signalisation pro-apoptotique. Grâce à cette activité apoptotique, UNC5B agirait comme une contrainte de progression pour les tumeurs, en induisant l'apoptose des cellules tumorales s'étant développées en l'absence du ligand, et agirait donc comme suppresseur de tumeurs. Au cours de l'échappement tumoral, les cellules tumorales s'adaptent en perdant l'expression de UNC5B, en produisant la nétrine 1 de manière autocrine, ou encore en modifiant la voie pro-apoptotique en aval du récepteur. Récemment, notre laboratoire a développé un anticorps ciblant la nétrine 1, en empêchant sa fixation au récepteur, permettant de favoriser son activité pro-apoptotique. Cependant, ce traitement n'est efficace seulement dans les cellules tumorales n'ayant pas subi de modification des voies de signalisation en aval du récepteur. Face à cette problématique, le but de ce projet de thèse est de mieux comprendre la signalisation pro-apoptotique du récepteur à dépendance UNC5B, en identifiant de nouveaux partenaires, et d'apporter un regard nouveau sur les stratégies thérapeutiques déjà existantes. Nos résultats mettent en évidence l'implication d'un complexe faisant intervenir COMMD2 et l'ubiquitine ligase E3 CRL3. Après induction de UNC5B, ce complexe va poly-ubiquitiner la protéine anti-apoptotique Mcl-1 et la mener à sa dégradation par le protéasome, provoquant ainsi l'apoptose par perméabilisation mitochondriale. Nous avons pu ainsi imaginer une nouvelle approche thérapeutique, combinant l'interférence à la nétrine-1 avec d'autres agents ciblant les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2, qui a fourni des résultats encourageants.

Belonging to the dependence receptor family, UNC5B is able to induce two opposite signaling: when the ligand, netrin-1, is present, it induces a signalization of cell survival, differentiation or migration, whereas in the absence of the ligand it actively induces a pro-apoptotic signaling. Because of this pro-apoptotic activity, UNC5B would act as tumor suppressor inducing the apoptosis of tumor cells that proliferate in excess compared to the limiting amount of ligand. During the tumor progression, tumoral cells escape cell death induced by UNC5B by losing the expression of the receptor, by producing netrin-1 in an autocrine way, or by modifying the downstream pro-apoptotic pathways. Recently, our lab developed an antibody allowing to target netrin-1, by blocking its interaction with the receptor, allowing to enable its pro-apoptotic activity. However, this treatment is efficient only in the tumoral cells that are not modified for the downstream pro-apoptotic pathways of the receptor. To answer this problem, the goal of my thesis is to decipher the pro-apoptotic signaling of the dependence receptor UNC5B by identifying new partners, and to bring a new sight on existing therapeutic strategies. Our results show the implication of a complex involving COMMD2 and the E3 ubiquitin ligase CRL3. After UNC5B induction, the complex will ubiquitinate the anti-apoptotic protein Mcl-1, and will lead to its proteasomal degradation, triggering therefore mitochondrial permeabilization and apoptosis. Then, we were able to set up a new therapeutic approach, combining netrin-1 interference with other drugs targeting the anti-apoptotic Bcl-2 family, which provides encouraging results.