



HAL
open science

Rôle oncogénique de nétrine-1 dans la plasticité cellulaire : mécanismes d'action et potentiel thérapeutique. Exemples des cancers mammaires,ovariens et des synovialosarcomes

Camille Victoor

► To cite this version:

Camille Victoor. Rôle oncogénique de nétrine-1 dans la plasticité cellulaire : mécanismes d'action et potentiel thérapeutique. Exemples des cancers mammaires,ovariens et des synovialosarcomes. Biologie cellulaire. Université Claude Bernard - Lyon I, 2023. Français. NNT : 2023LYO10148 . tel-04577921

HAL Id: tel-04577921

<https://theses.hal.science/tel-04577921>

Submitted on 16 May 2024

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.



**THESE de DOCTORAT DE
L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1**

**École Doctorale N° 340
Biologie Moléculaire Intégrative et Cellulaire**

Discipline : Biologie Cellulaire et Moléculaire

Soutenue publiquement le 19/09/2023, par :
Camille VICTOOR

**Rôle oncogénique de nétrine-1 dans la
plasticité cellulaire : mécanismes d'action
et potentiel thérapeutique.
Exemples des cancers mammaires,
ovariens et des synovialosarcomes**

Devant le jury composé de :

DEVOUASSOUX Mojgan	PU-PH, HCL, Lyon	Présidente du jury
GINESTIER Christophe	Directeur de Recherche, CRCM, Marseille	Rapporteur
JANOUEIX Isabelle	Directrice de Recherche, Institut Curie, Paris	Rapporteuse
CHIBON Frédéric	Directeur de Recherche, CRCT, Toulouse	Examineur
LAVIAL Fabrice	Directeur de Recherche, CRCL, Lyon	Examineur
BERNET Agnès	Professeure des Universités, CRCL, Lyon	Directrice de thèse
DUCAROUGE Benjamin	Chef de projet R&D, Netris Pharma, Lyon	Invité
MEHLEN Patrick	Directeur de Recherche, CRCL, Lyon	Invité

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

Président du Conseil Académique

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil Formation et Vie Universitaire

Vice-président de la Commission Recherche

Directeur Général des Services

Pr. Frédéric FLEURY

Pr. Hamda BEN HADID

Pr. Christophe VITON

Pr. Philippe CASSAGNAU

M. Pierre ROLLAND

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Directeur : Pr. G. RODE

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Directeur : Pr. P. PAPAREL

Faculté d'Odontologie

Directeur : Pr. J.-C. MAURIN

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Directeur : Pr. C. DUSSART

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Directeur : Pr. J. LUAUTE

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Institut National Supérieur du Professorat et de l'Éducation

Directeur : M. P. CHAREYRON

Institut Universitaire de Technologie Lyon 1

Directeur : Pr. M. MASSENZIO

Institut de Sciences Financière et d'Assurances

Directeur : M. N. LEBOISNE

Observatoire de Lyon

Directrice : Pr. I. Daniel

Polytech Lyon

Directeur : Pr. E. PERRIN

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Directeur : Pr. G. BODET

UFR Chimie, Mathématique, Physique

Directeur : Pr. B. ANDRIOLETTI

UFR Biosciences

Directrice : Pr. K. GIESLER

Génie Electrique des Procédés

Directrice : Pr. R. FERRIGNO

Informatique

Directrice : Pr. S. BOUAKAZ BRONDEL

Mécanique

Directeur : M. M. BUFFAT

Remerciements

Alors que s'achève cette belle aventure qu'a été le doctorat, je tiens avant tout à remercier les différents membres de mon jury : le Pr Mojgan DEVOUASSOUX, le Dr Christophe GINESTIER, le Dr Isabelle JANOUÉIX, le Dr Frédéric CHIBON et le Dr Fabrice LAVIAL, pour leur bienveillance lors de ma soutenance, permettant ainsi des discussions constructives autour de mon projet. Merci à eux d'avoir donné de leur temps pour évaluer mon travail de thèse, notamment mes rapporteurs, les Dr GINESTIER et Dr JANOUÉIX, pour leurs retours constructifs sur mon manuscrit qui m'ont permis d'aborder ma soutenance de façon plus confiante. Un merci tout particulier au Dr Fabrice LAVIAL qui faisait également parti de mon comité de suivi de thèse et m'a donc suivi depuis le début de mon projet : merci à lui pour ses encouragements, son soutien et son aide durant ces trois années. Je remercie également le Dr Jean-Yves SCOAZEC, deuxième membre de mon comité de suivi de thèse pour son temps et ses précieux conseils dans l'avancée de mon projet.

Cette thèse n'aurait jamais pu voir le jour sans l'accueil du Dr Patrick MEHLEN au sein de son laboratoire et de Netris Pharma, merci donc à lui pour sa confiance durant mon doctorat. Bien évidemment, un grand merci également à ma directrice de thèse, le Pr Agnès BERNET, pour son encadrement et notamment son investissement dans la correction de ce manuscrit (qui n'a pas toujours été de tout repos !). Merci à elle pour son optimisme sur mon travail et d'avoir toujours réussi à trouver les bons mots pour me remotiver lorsque cela a été nécessaire. Je remercie également mon co-encadrant, le Dr Benjamin DUCAROUGE, pour ses conseils scientifiques tout au long de mes projets et de m'avoir permis de développer mon esprit critique, mon autonomie et ma débrouillardise qui me seront essentiels dans la suite de ma carrière.

Cette expérience qu'a été la thèse n'aurait pas été la même sans la merveilleuse équipe que j'ai eu la chance d'avoir à mes côtés. Il me faudrait des pages et des pages pour pouvoir exprimer toute ma reconnaissance envers les personnes concernées mais je vais tout de même essayer d'être concise.

Je tiens tout d'abord à remercier M. David NEVES qui m'a accueilli dans son bureau à mon arrivée et qui m'a si souvent conseillé et soutenu dans mes expérimentations. Merci à lui pour les pauses diabètes, les découvertes musicales et ses anecdotes mais aussi pour tous les autres bons moments qu'il serait bien trop long de lister ici. Merci David de m'avoir aidée à devenir un petit poisson.

Un grand merci également à Mélanie BELLINA, que dis-je, au Dr Mélanie BELLINA maintenant ! J'ai eu la chance de réaliser la totalité de ma thèse à ses côtés et cette aventure n'aurait pas été la même sans elle. Je la remercie du fond du coeur pour sa relecture de ce manuscrit, sa bonne humeur, son soutien sans failles et tous les beaux souvenirs partagés avec elle. Merci pour tout Méli-mélo.

J'ai aussi eu le plaisir de rencontrer le Dr Emilie BRANCHE dont l'investissement dans la vie quotidienne de Netris nous a tous permis de travailler dans un cadre agréable et organisé, quoi de mieux que de connaître dès 10h l'heure exacte de la pause déjeuner ? Merci à elle d'avoir eu la porte de son « bureau des plaintes » toujours ouverte et surtout pour son (énorme) investissement dans la correction de ce manuscrit. Merci Emilie pour tout cela (et bien plus) mais aussi de partager mon humour, on se retrouvera sur un tabouret !

De même, je remercie Victoria BILLECOCQ, la maman des étudiants de Netris. J'ai eu la chance de travailler dans un cadre bienveillant que l'on doit en grande partie à Victoria, toujours soucieuse de notre bien-être. Plus personnellement, je tiens à la remercier pour son soutien quotidien, ces gentils messages qui remontent toujours le moral et ses « conseils pour la vie ». Merci d'avoir été mon agent de babysitting et surtout de lire aussi vite tous mes livres pour que je puisse avoir quelqu'un avec qui en parler ! Ma bibliothèque reste à ton entière disposition.

Je tiens aussi à remercier le Dr Laure BOUGAREL et Amélie BECAR pour leur aide dans la finalisation et la correction de ce manuscrit. Merci également à Nerea MUÑOZ, Ruxanda CHIRA, Nicolas BRAISSAND, Candice MORIN, Léna MARLHOUX et François GRUET pour le soutien émotionnel. Merci à tous pour votre temps, vos oreilles attentives et pour tous les joyeux moments partagés avec vous. J'ai également pu compter sur l'aide précieuse du Dr David GOLDSCHNEIDER dans mes expérimentations et je l'en remercie. Merci également aux trois étudiants qui sont passés chez Netris Pharma dans le cadre de leurs stages, Doha BOUKAOUI, Mohsen SAÏDI et Nicolas BRAISSAND, pour leur travail et leur investissement dans mes projets.

Bien que l'essentiel de ma thèse se soit déroulé dans les locaux de Netris Pharma, je tiens également à remercier les membres de l'équipe du Dr Patrick Mehlen, notamment le Dr Nicolas RAMA et Benoit SAMSON pour leur travail bioinformatique dans mes projets. Merci également à toute l'équipe étudiante « de l'autre côté » : Lisa, Maeva, Kristina, Thomas, Ambroise, Elisa, Silvia, pour leur aide et les nombreux bons moments partagés avec eux.

Comme beaucoup le savent déjà, la thèse nécessite beaucoup d'investissement. Pour ma part, j'ai pu compter sur un immense soutien de la part de mon entourage que je tiens à remercier ici.

Tout d'abord, merci à Sonia BRAHIM et Julie BRULET que j'ai rencontré au cours de mon master et qui ont été présentes tout au long de ce parcours. Merci à elles pour leur écoute, leur soutien et tous ces moments (passés et à venir) partagés avec elles. Merci également à Eline POLONI, la moins scientifique de mes amies qui a pourtant tant entendu parler de cellules, de souris et d'épigénétique et qui, curieusement, a toujours envie de partir en vacances avec moi.

Un grand merci également à mon humain de compagnie, Damien TERRAGE, que j'ai la chance d'avoir eu à mes côtés tout au long de ma thèse. Merci pour ton soutien, ton aide et tes bons petits plats. Merci d'avoir toujours réussi à me faire relativiser et à me faire rire lorsque j'en avais besoin. Comme promis : « je te remercie de m'avoir prêté ton poste de télétravail avec ton super écran et ta chaise extrêmement confortable afin de pouvoir rédiger ce manuscrit dans de bonnes conditions pendant que tu avais mal aux fesses sur les chaises de la cuisine ». Merci également à sa maman, Catherine JAULT, qui a pris de son temps pour faire la correction des (nombreuses) fautes d'orthographe de ce manuscrit.

Enfin, les meilleurs pour la fin, merci à mon grand Papa et à ma petite Maman sans qui rien de tout cela n'aurait été possible. Cela fait 29 ans maintenant qu'ils m'apportent un soutien inébranlable dans tout ce que j'entreprends et un manuscrit entier ne serait pas suffisant pour leur exprimer ma reconnaissance, je me contenterai donc d'un simple mais immense merci.

***Rôle oncogénique de nétrine-1 dans la
plasticité cellulaire : mécanismes d'action et
potentiel thérapeutique.
Exemples des cancers mammaires, ovariens
et des synovialosarcomes***

Table des matières

Remerciements	5
Liste des abréviations	13
Table des figures	17
Table des tableaux	18
Préambule	19
INTRODUCTION	21
Chapitre 1 : Nétrine-1 : d'une molécule de guidage au cours du développement à une cible thérapeutique pour le traitement de nombreux cancers	23
1.1 Histoire d'une découverte.....	23
1.2 Structure de nétrine-1.....	24
1.2.1 Structure du gène & régulation de l'expression	24
1.2.2 Structure protéique	25
1.3 Les récepteurs de nétrine-1	26
1.3.1 La famille des récepteurs UNC5.....	27
1.3.2 La famille des récepteurs DCC	27
1.3.2.1 Le récepteur DCC	27
1.3.2.2 Néogénine	28
1.3.3 Les autres récepteurs de nétrine-1.....	28
1.3.3.1 Adénosine 2b	29
1.3.3.2 Down Syndrome Cell Adhesion Molecule	29
1.3.3.3 Melanoma Cell Adhesion Molecule	29
1.3.3.4 Protéine précurseur β -Amyloid	29
1.3.3.5 Intégrines $\alpha 6\beta 4$ et $\alpha 3\beta 1$	30
1.4 Les différents rôles de nétrine-1	30
1.4.1 Un rôle charnière comme ligand prototypique des récepteurs à dépendance.....	30
1.4.1.1 L'absence de nétrine-1 : permis de tuer	32
1.4.1.1.1 Une localisation clé	32
1.4.1.1.2 <i>Modus operandi</i> d'UNC5-B.....	33
1.4.1.1.3 <i>Modus operandi</i> de DCC.....	34
1.4.1.2 La présence de nétrine-1 : mourir peut attendre	35
1.4.2 Nétrine-1 au cours du développement : un rôle physiologique	35
1.4.2.1 Un rôle de guide.....	35
1.4.2.2 Un rôle dans la morphogenèse des organes branchés	36
1.4.2.3 Un rôle dans l'angiogenèse	37
1.4.2.4 Un rôle de maintien de la pluripotence	37
1.4.3 Nétrine-1 chez l'adulte : un rôle pathologique.....	38
1.4.3.1 Expression de nétrine-1 et de ses principaux récepteurs dans les tissus sains adultes ..	38
1.4.3.2 Nétrine-1 et ses récepteurs dans différents contextes pathologiques	40
1.4.3.2.1 Nétrine-1 & Cancers	40
1.4.3.2.2 Nétrine-1 & inflammation	41
1.4.3.2.2.1 Un rôle anti-inflammatoire	42
1.4.3.2.2.2 Un rôle pro-inflammatoire.....	42
1.4.3.2.3 Nétrine-1 & douleur	42
1.4.3.2.4 Nétrine-1 & maladies neurodégénératives	43
1.4.3.2.4.1 La maladie d'Alzheimer.....	43
1.4.3.2.4.2 La maladie de Parkinson	44
1.4.3.2.4.3 La chorée de Huntington	44
1.5 Nétrine-1, une cible thérapeutique.....	44
1.5.1 Stratégie	44

1.5.2	Le NP137	45
1.5.2.1	Développement pré-clinique	45
1.5.2.2	Phase clinique	45
1.5.2.2.1	Première étude chez l'Homme	45
1.5.2.2.1.1	La phase d'escalade de dose.....	46
1.5.2.2.1.2	La première phase d'extension.....	47
1.5.2.2.1.3	La deuxième phase d'extension.....	47
1.5.2.2.2	GYNET.....	48
1.5.2.2.3	IMMUNONET.....	48
1.5.2.2.4	Liver-NET1	49
1.5.2.2.5	LAP-NET1	49
1.5.2.2.6	Essais à venir	49
1.5.2.3	Autres applications du NP137 : les thérapies vectorisées.....	50
Chapitre 2 : Les cellules souches cancéreuses, un challenge thérapeutique.....		52
2.1	Les cellules souches cancéreuses à l'origine de l'hétérogénéité tumorale.....	52
2.2	Plasticité des CSCs : comment et pourquoi ?	53
2.2.1	La niche des CSCs contrôle l'induction de l'EMT et la plasticité des CSCs	54
2.2.1.1	Vision globale	54
2.2.1.2	Rôle des fibroblastes associés au cancer	55
2.2.2	Les facteurs de transcription de l'EMT	55
2.2.3	Un rôle majeur de la plasticité des CSCs dans la dissémination métastatique.....	56
2.3	Voies de signalisation des CSCs	58
2.3.1.1	La voie Wnt	58
2.3.1.1.1	La voie Wnt/ β -caténine.....	58
2.3.1.1.2	Les voies non-canoniques	59
2.3.1.1.3	Les voies Wnt dans les CSCs mammaires et ovariennes	61
2.3.1.2	La voie Hippo.....	61
2.3.1.2.1	Description de la voie	61
2.3.1.2.2	La voie Hippo dans les CSCs mammaires et ovariennes.....	62
2.4	Propriétés des CSCs	63
2.4.1	Auto-renouvellement et différenciation	63
2.4.2	Résistance aux traitements	64
2.4.2.1	Résistance aux chimio- et radio- thérapies	64
2.4.2.1.1	Éviter l'exposition cellulaire aux thérapies.....	64
2.4.2.1.2	Éviter l'exposition moléculaire aux thérapies	64
2.4.2.1.3	Éviter les conditions nécessaires pour le fonctionnement des traitements	65
2.4.2.1.3.1	Inactivation intracellulaire	65
2.4.2.1.3.2	Quiescence et dormance	66
2.4.2.1.4	Réparer les dommages causés	66
2.4.2.1.5	Mobiliser des pouvoirs anti-apoptotiques	66
2.4.2.2	Résistance aux immunothérapies	67
2.5	Méthodes d'isolation et d'étude des CSCs	67
2.5.1	Formation de sphères.....	67
2.5.2	Transplantation sériée.....	68
2.5.3	Sélection par chimio- et radio- thérapies	69
2.5.4	Sélection par des marqueurs extracellulaires.....	69
2.5.5	Méthode « Side population »	70
2.5.6	Activité enzymatique de l'ALDH	70
Chapitre 3 : Les synoviosarcomes, focus sur un sarcome épigénétiquement altéré		71
3.1	Présentation médicale de la pathologie.....	71
3.1.1	Histoire d'une maladie qui porte mal son nom	71
3.1.2	Épidémiologie et classification	72
3.1.3	Présentation clinique et diagnostic	73
3.1.3.1	Examens d'imagerie	74
3.1.3.2	Examens en laboratoire	74
3.1.3.2.1	Analyse par immunohistochimie.....	75

3.1.3.2.1.1	Marqueurs les plus communs.....	75
3.1.3.2.1.2	Transducin-Like Enhancer of Split 1.....	75
3.1.3.2.1.3	New-York-Esophageal Squamous Cell Carcinoma-1.....	75
3.1.3.2.2	Analyse moléculaire des cellules.....	76
3.1.4	Traitements.....	76
3.1.4.1	Chirurgie.....	76
3.1.4.2	Radiothérapie.....	77
3.1.4.3	Chimiothérapie.....	77
3.1.4.4	Axes thérapeutiques en développement.....	78
3.1.4.4.1	Thérapies ciblées	78
3.1.4.4.2	Immunothérapies.....	79
3.1.4.4.3	Traitement métabolique.....	79
3.2	Étiologie de la maladie : un chaos épigénétique induit par SS18-SSX.....	80
3.2.1	Rappels d'épigénétique.....	80
3.2.1.1	La chromatine et les histones.....	80
3.2.1.1.1	Structure de la chromatine.....	80
3.2.1.1.2	Le nucléosome.....	81
3.2.1.2	Modulation de l'expression génique par la modification des protéines histones.....	82
3.2.1.2.1	Le code histone.....	82
3.2.1.2.2	La chromatine bivalente, un état particulier.....	84
3.2.1.3	Modulation de l'expression génique par la méthylation de l'ADN.....	84
3.2.1.4	Modulation de l'expression génique par les ARN non-codants.....	85
3.2.1.5	Modulation de l'expression génique par les protéines Polycomb et Tritorax.....	85
3.2.1.5.1	Les protéines Polycomb.....	86
3.2.1.5.1.1	PRC1 & PRC2.....	86
3.2.1.5.1.2	Le domaine chromatinien polycomb.....	87
3.2.1.5.2	La régulation génique médiée par les PRC.....	88
3.2.1.5.2.1	Une répression de la transcription.....	88
3.2.1.5.2.2	... mais aussi une potentialisation de son activation.....	88
3.2.1.6	Les protéines tritorax.....	88
3.2.1.7	Dynamique de l'opposition des complexes BAF (Trx) et PRC (PcG).....	90
3.3	SS18.....	91
3.3.1	Structure de SS18.....	91
3.3.2	Activation de la transcription.....	92
3.3.3	Répression de la transcription.....	93
3.4	SSX.....	94
3.4.1	Structure de SSX.....	94
3.4.2	Fonctions de SSX.....	95
3.4.2.1	Répression de la transcription.....	95
3.4.2.2	Activation de la transcription.....	95
3.5	SS18-SSX.....	96
3.6	Mécanismes impliqués dans la transformation oncogénique par SS18-SSX.....	98
3.6.1	Interactions protéiques de SS18 et SSX.....	98
3.6.1.1	On prend les mêmes et on recommence.....	98
3.6.1.2	... mais pas seulement !.....	98
3.6.1.2.1	Snail, Slug et la régulation d'E-cadhérine.....	98
3.6.1.2.2	ATF2 et TLE1.....	100
3.6.2	SS18-SSX, BAF et PRC : une combinaison complexe.....	100
3.6.2.1	Altérations des complexes BAF par SS18-SSX.....	100
3.6.2.2	Redistribution des complexes BAF sur les domaines chromatinien occupés par polycomb.....	102
3.6.2.3	ncPRC1.1 dans l'oncogénicité de SS18-SSX.....	104
3.7	Cellule d'origine du SS.....	105
3.7.1	Progéniteurs musculaires.....	105
3.7.2	Cellules Souches Mésenchymateuses.....	106

RÉSULTATS..... 108

Exemple 1 : Rôle de nétrine-1 dans la plasticité cellulaire des cellules souches cancéreuses mammaires et ovariennes	110
Rationnel et objectif du projet de recherche	112
Résultats	114
Discussion	142
Exemple 2 : Nétrine-1 dans les synoviosarcomes : rôles, régulation et potentiel thérapeutique	148
Rationnel et objectif du projet de recherche	150
Résultats	151
Discussion et perspectives	176
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	186
BIBLIOGRAPHIE	192
SERMENT DU DOCTEUR	222
Résumé	227
Abstract	227

Liste des abréviations

a.a	Acide aminé
A2b	Adénosine 2b
ADD	Addiction Dependence Domain
AF10	Acute lymphoblastic leukemia fused gene from chromosome 10
AMPC	Adenosine MonoPhosphate cyclique
ANSM	Agence Nationale de Sécurité du Médicament
APP	Protéine Précurseur β -Amyloid
ASS1	Arginino-Succinate Synthetase 1
ATF2	Activating Transcription Factor 2
ATP	Adenosine TriPhosphate
BAF	BRM or BRG Associated Factor
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BCOR	Bcl6 Corepressor
BRD	BRomoDomain-containing protein
BRG1	Brahma Related Gene 1
CBAF	canonical BAF
CD	Cluster of Differentiation
CGI	îlots CpG
ChIP-seq	Chromatin ImmunoPrecipitation Sequencing
CIP2A	Cancerous Inhibitor of PP2A
CK	Cytokeratines
COMMD2	Copper Metabolism Murr1 Domain Containing 2
CSC	Cellule Souche Cancéreuse
CSM	Cellule Souche Mésoenchymateuse
DAPK	Death Associated Protein Kinase
DCC	Deleted in Colorectal Cancer
DD	Death Domain
DIP13 α	DCC-interacting Protein 13-alpha
DOT1L	Disruptor Of Telomeric silencing 1-L
DSCAM	Down Syndrome Cell Adhesion Molecule
EED	Embryonic Ectoderm Development
EGF	Epidermal Growth Factor
EMA	Antigène épithélial membranaire
EMT	Transition Epithélio-Mésoenchymateuse
EZH1/2	Enhancer of Zeste 1/2
FISH	Fluorescence In Situ Hybridization
FNIII	Fibronectine III
GAS41	Glioma Amplified sequence 41
GPI	GlycoPhosphatidylInositol
GSK	Glycogen Synthase Kinase

HAT	Histone AcétylTransférase
HDAC	Histone DéACétylase
HIF-1 α	facteur 1- α induit par l'hypoxie
HKMT	Histone Lysine MethylTransférase
HMT	Histone MéthylTransferase
Ig	Immunoglobuline
IHC	ImmunoHistoChimie
IMRT	Radiothérapie à Intensité Modulée
iPS	Cellule souche pluripotente induite
IRM	Imagerie à Résonance Magnétique
KD	Knockdown - diminution de l'expression
KDM	Lysine DÉMéthylase
KRAB	Krüppel-associated box
LHX4	LIM homeobox protein 4
MAPK	Mitogen-activated Protein Kinases
MCAM	Melanoma Cell Adhesion Molecule
Mcl-1	Myeloid Cell Leukemia-1
mESC	Cellules souches embryonnaires murines
MET	Transition mésenchymo-épithéliale
miRNA	micro ARNs
MPT	Modification Post-Traductionnelle
mSin3A	mammalian Switch-independant 3A
Myf5	MYogenic Factor 5
ncBAF	non-canonical BAF
Neo-1	Néogénine-1
NF κ B	Nuclear Factor κ B
NLS	Nuclear Localization Signal
NTR	Module nétrine
NY-ESO-1	New-York Esophageal Squamous Cell Carcinoma-1
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PAX	Paired box gene
pb	paire de base
PBAF	Polybromo-Associated BAF
PcG	Polycomb
PCGF1-6	Polycomb Ring Finger 1-6
PD-1	Programmed Death 1
PDGF-R	Récepteurs aux Facteurs de Croissance Dérivés des Plaquettes
PDL-1	Programmed Death Ligand 1
PMN-MDSC	PolyMorphoNuclear Myeloid-Derived-Suppressor Cells
PP2A	Protein Phosphatase 2A
PRC	Polycomb Repressive Complex
PRMT	Protéine Arginine MéthylTransférase
PROTACs	Proteolysis-Targeting Chimeras

RAB3IP	Ras-like GTPase interactor
RD	Récepteur à Dépendance
RGMa	Repulsive Guidance Molecule a
RP2D	Dose Recommandée pour la Phase 2
RT-qPCR	Reverse Transcription Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction
scRNAseq	single cell RNA sequencing
SHH	Sonic HedgeHog
SIP/CoAA	SS18-interacting protein/Co-activator activator protein
siRNA	small interferent RNA
SMARCA2	SWI/SNF related, matrix associated, actin-dependant regulator of chromatin, subfamily A, me
SNF	Sucrose Non-Fermentable
SNH	domaine N-terminal Homologue à SS18
SS	Synoviosarcome
SS18	Synovial Sarcoma 18
SSX	Synovial Sarcoma X breakpoint
SSX2IP	Synovial Sarcoma X breakpoint 2 interacting protein
SSXDD	SSX Divergent Domain
SSXRD	SSX Repression Domain
STM	Sarcome des Tissus Mous
SUZ12	Suppressor of Zeste 12
SWI/SNF	SWItch/Sucrose Non-Fermentable
TERT	Téломérase
TKI	Inhibiteurs des Tyrosine Kinases
TLE1	Transducin-Like Enhancer of split 1
Trx	Tritorax
UNC5	UNCoordinated5
UNC6	UNCoordinated6
UPA	Unc-Pidd-Ankyrins
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGF-R	Récepteurs aux Facteurs de Croissance de l'Endothélium Vasculaire
Zu-5	Zona-occludens/unc-5 homology domain

Table des figures

Figure 1 : Structure du gène de nétrine-1.....	24
Figure 2 : Arbre phylogénétique des protéines de la famille des nétrines	25
Figure 3 : Structure schématique des nétrines chez les vertébrés	26
Figure 4 : Structure schématique des principaux récepteurs de nétrine-1	27
Figure 5 : Structure schématique des autres récepteurs de nétrine-1	28
Figure 6 : Représentation schématique du principe des récepteurs à dépendance.....	31
Figure 7 : La famille des récepteurs à dépendance.....	32
Figure 8 : Voies de signalisations négatives induites par UNC5B.....	34
Figure 9 : Voie de signalisation négative potentielle de DCC.....	35
Figure 10 : Expression de nétrine-1 et de ses récepteurs dans les tissus humains adultes sains	Erreur ! Signet non défini.
Figure 11 : Mécanismes d'échappement des cellules tumorales à la signalisation des récepteurs à dépendance	40
Figure 12 : Surexpression de netrin-1 dans les cancers	41
Figure 13 : Représentation schématique du NP137 et site de liaison à nétrine-1.....	45
Figure 14 : Méthode d'escalade de dose 3+3	46
Figure 15 : Modèles hypothétiques de l'hétérogénéité tumorale.....	53
Figure 16 : Schéma des interactions des CSCs avec leurs niches au niveau cellulaire et moléculaire	54
Figure 17 : EMT/MET et propriétés associées	57
Figure 18 : La voie canonique Wnt- β -caténine	59
Figure 19 : Schéma des voies de signalisation Wnt non-canoniques.....	60
Figure 20 : Schéma de la voie de signalisation de la voie Hippo.....	62
Figure 21 : Représentation schématique des deux types de divisions des cellules souches ..	63
Figure 22 : Représentation schématique de la technique de formation des sphères	68
Figure 23 : Coupes histologiques de sarcome monophasique et biphasique	72
Figure 24 : Coupes histologiques des différents sous-types de synoviosarcomes peu différenciés	73
Figure 25 : Représentation schématique des différents niveaux de compaction de la chromatine.....	81
Figure 26 : Représentation schématique du nucléosome	82
Figure 27 : Composition des complexes PRC chez les mammifères	86
Figure 28 : Formation et diffusion des domaines chromatiniens polycomb	87
Figure 29 : Répression de l'expression génique par les PRC [249].....	88
Figure 30 : Composition des complexes BAF	89
Figure 31 : Cinétique de l'opposition des complexes BAF et PRC	90
Figure 32 : Schéma de la structure de SS18	91
Figure 33 : Schéma des Interactions protéiques avec SS18.	93
Figure 34 : Schéma de la structure des protéines SSX.	94
Figure 35 : Schéma des interactions protéiques avec SSX.	96
Figure 36 : Schéma de la translocation t(X;18)(p11.2 ;q11.2).....	97
Figure 37 : Schéma de la structure de la protéine de fusion SS18-SSX.....	97
Figure 38 : Probable régulation de l'expression d'E-cadhérine par les protéines SS18-SSX ...	99

Figure 39 : Modulation de l'abondance des différents sous-types de complexe BAF par SS18-SSX	102
Figure 40 : Schéma de la redistribution des complexes BAF induite par SS18-SSX	103
Figure 41 : Rôle pronostic de nétrine-1 dans les cancers du sein de type luminal A.....	146

Table des tableaux

Tableau 1 : Principaux marqueurs de surface des CSCs mammaires.....	69
Tableau 2 : Principaux marqueurs de surface des CSCs ovariennes	69
Tableau 3 : Modifications post-traductionnelles des histones, acteurs et effets sur la chromatine.....	83
Tableau 4 : Principales marques histones et enzymes associées.	83

Préambule

La plasticité cellulaire fait référence à la capacité des cellules à changer de phénotype ou de destin cellulaire en réponse à des signaux environnementaux ou à des stimuli intracellulaires. Cela signifie que les cellules peuvent acquérir de nouvelles fonctions, se différencier ou même retrouver des propriétés de cellules dites souches. Cette plasticité cellulaire est essentielle pour le développement embryonnaire ou encore la régénération tissulaire. Cependant, elle joue également un rôle critique dans des contextes pathologiques comme par exemple les cancers.

Dans un contexte cancéreux, la plasticité cellulaire joue un rôle crucial dans la progression tumorale et la résistance aux traitements. En effet, les cellules cancéreuses peuvent subir des changements phénotypiques qui les rendent plus agressives, invasives et résistantes aux médicaments. La plasticité cellulaire dans les cancers est régulée par un réseau complexe de voies de signalisation, d'interactions entre les cellules tumorales et leur microenvironnement, ainsi que par des changements épigénétiques et génétiques. Les facteurs de croissance, les cytokines, les signaux inflammatoires et les modifications de la matrice extracellulaire sont autant de stimuli qui peuvent influencer la plasticité cellulaire. Comprendre les mécanismes qui régulent la plasticité cellulaire dans les cancers est essentiel pour développer de nouvelles approches thérapeutiques. En effet, un ciblage de ces voies pourrait permettre de limiter la capacité des cellules cancéreuses à se transformer et à développer des résistances. Parmi les stimuli pouvant influencer la plasticité, mon travail de thèse a permis d'identifier nétrine-1, une petite protéine de la famille des laminines se trouvant être surexprimée dans un grand nombre de cancers.

Ainsi, ce manuscrit est le résultat de mes trois années de travail de thèse que j'ai réalisé de novembre 2020 à ce jour au sein du laboratoire du Dr Patrick Mehlen et de la biotech NETRIS Pharma. Durant ma thèse, j'ai travaillé sur le rôle de nétrine-1 dans la plasticité cellulaire à travers deux exemples : celui des cellules souches cancéreuses mammaires et ovariennes ainsi que celui des synoviosarcomes.

Dans un premier temps, une introduction à la protéine nétrine-1, sa structure, ses fonctions ainsi que son potentiel clinique vous sera faite. Un second chapitre vous présentera ensuite les cellules souches cancéreuses de façon globale à savoir leur lien avec la plasticité cellulaire et leurs propriétés spécifiques. Enfin, un troisième chapitre vous présentera les synoviosarcomes, des cancers rares dans lesquels une protéine pathognomonique induit un important désordre épigénétique. A l'issue de cette introduction, les résultats de mes travaux de thèse vous seront présentés sous la forme d'articles, chacun suivi d'une discussion et des perspectives de ces projets. Enfin, une conclusion terminera ce manuscrit en discutant de l'avantage sélectif que confère nétrine-1 aux cellules via ses modulations de la plasticité cellulaire.

INTRODUCTION

Chapitre 1 : Nétrine-1 : d'une molécule de guidage au cours du développement à une cible thérapeutique pour le traitement de nombreux cancers

1.1 Histoire d'une découverte

Dans tout le règne animal, allant des nématodes, tel que *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) aux mammifères tel que l'Homme, le développement du système nerveux nécessite la connexion de chaque neurone à leur cellule cible rendu possible grâce à une extension du corps cellulaire du neurone appelé axone. Cependant, l'axone en cours de croissance parcourt parfois d'importantes distances, pouvant aller jusqu'à plusieurs centaines de fois la taille du corps cellulaire. La question « Comment l'axone est-il guidé jusqu'à sa cellule cible ? » fut donc rapidement soulevée au sein de la communauté scientifique.

Santiago Ramón y Cajal, un scientifique espagnol, postula en 1899 que le cône de croissance, *i.e.* l'extrémité distale de l'axone, est guidé/attiré par des molécules chimiques diffusibles sécrétées par les cellules cibles [1].

Ce n'est qu'en 1992, plus de 90 ans après le postulat de Santiago Ramón y Cajal que le premier gène d'une molécule de guidage a été découvert chez *C. elegans*. Ce gène codant pour une protéine dérivée de la famille des laminines, *UNCoordinated6* (UNC6), a été démontré pour être nécessaire au bon déroulement de la migration axonale dans cet organisme [2].

Deux ans plus tard, en 1994, Marc Tessier-Lavigne et ses collaborateurs mettent en évidence deux protéines orthologues à UNC6 chez les vertébrés qui seront nommées nétrine-1 et nétrine-2 en référence à leurs propriétés chimiotropes, *netr* signifiant « celui qui guide » en Sanskrit [3]. Par la suite, plusieurs molécules de nétrine furent identifiées dans de multiples espèces vertébrées et invertébrées permettant ainsi la mise en évidence d'un rôle conservé pour le guidage de la migration cellulaire et de la croissance axonale dans le système nerveux embryonnaire [4].

Depuis sa découverte, nétrine-1 est l'un des membres de la famille des nétrines qui a été le plus étudié. En sus du rôle de guidage axonal, plusieurs travaux lui décrivent d'autres fonctions au sein du système nerveux comme par exemple dans la synaptogenèse [5], la régénération et le branchement axonal [6], [7] ou encore la modulation du système immunitaire [8].

Des activités en dehors du système nerveux lui ont également été décrites. Nétrine-1 est impliquée dans la morphogenèse des organes branchés tels que la glande mammaire [9] ou le poumon [10] mais également dans l'angiogenèse [11], la régulation de l'inflammation au sein de différents organes et pathologies [8] et la pluripotence cellulaire [12], [13]. Enfin, nétrine-1 a aussi été décrite dans un contexte tumoral où elle promeut la prolifération, la migration ainsi que la survie des cellules tumorales [14]–[16].

Dans la suite de ce chapitre, nous nous concentrerons principalement sur nétrine-1, qui est la plus connue et la mieux décrite. Nous verrons tout d'abord la structure de son gène puis sa structure protéique et ses similitudes/différences avec les autres protéines de sa famille.

Nous nous concentrerons ensuite sur ses récepteurs et ses différents rôles physiologiques et pathologiques pour finir par le potentiel thérapeutique qui lui est associé.

1.2 Structure de nétrine-1

1.2.1 Structure du gène & régulation de l'expression

Situé sur le chromosome 17, le gène *Ntn1* codant pour nétrine-1 se compose de sept exons dont seulement six sont codants [17]. Deux promoteurs ont été décrits, le premier (Promoteur A) est un promoteur classique régulant l'expression génique et situé en amont du premier exon sur lequel se fixe Nuclear Factor κ B (NF κ B). Le deuxième promoteur (Promoteur B) est un promoteur alternatif cryptique situé dans l'intron 1 de *Ntn1* (Figure 1). Ce dernier permet la synthèse d'une isoforme non sécrétée de la protéine, Δ N-nétrine-1, décrite par Delloye-Bourgeois *et al.* [18]. Chez cette dernière, le domaine N-terminal est tronqué et le domaine NTR possède un motif de localisation nucléolaire qui laisse supposer qu'elle pourrait jouer un rôle pro-tumoral en altérant la synthèse des ribosomes.

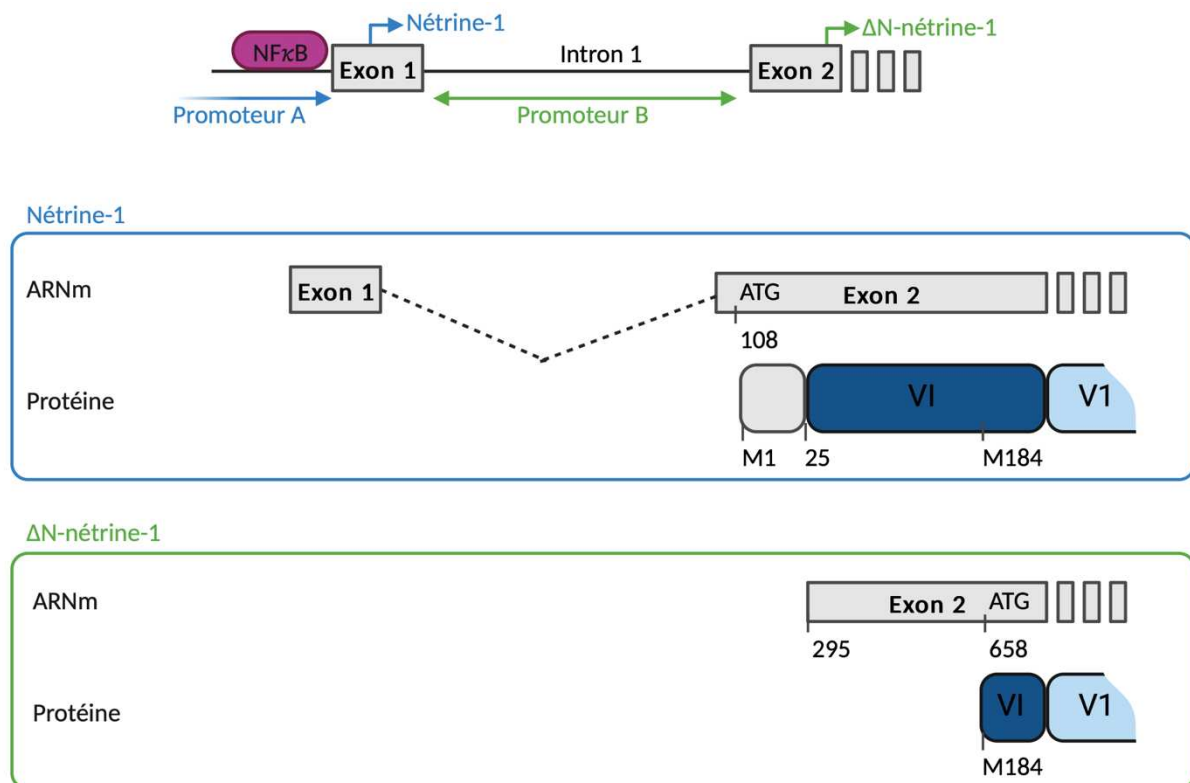


Figure 1 : Structure du gène de nétrine-1

D'après Delloye-Bourgeois *et al.*, 2012 [1].

Outre la régulation par NF κ B, d'autres mécanismes de régulation de nétrine-1 sont décrits dans la littérature.

En 2013, Paradisi *et al.* ont montré dans des modèles *in vitro* et *in vivo* que certains traitements tels que le cisplatine ou la doxorubicine entraînent une augmentation de l'expression de nétrine-1 et de ses récepteurs via le facteur de transcription p53. Comme nous le verrons plus tard dans ce manuscrit, ceci est un mécanisme de survie pouvant être

contourné par une interférence dans la fixation de nétrine-1 sur ses récepteurs, entraînant ainsi une mort cellulaire *in vitro* et un ralentissement de la croissance tumorale *in vivo* [19].

Plus tard, Grandin *et al.* ont démontré que la méthylation de l'ADN joue un rôle primordial dans différents cancers. Concernant la nétrine-1, une hyperméthylation du gène a été montrée pour être associée à une diminution de l'expression de la protéine dans les cellules cancéreuses *in vitro* et chez l'Homme [20], [21].

Récemment, des études ont montré une induction de l'expression de nétrine-1 par l'hypoxie [22], [23]. Bien que les mécanismes expliquant la régulation de nétrine-1 dans ce contexte sont peu décrits, on note cependant qu'une accumulation de p53 par l'hypoxie est largement documentée dans la littérature [24] confirmant le potentiel lien entre p53 et nétrine-1 précédemment évoqués dans les travaux de Paradisi *et al.* [19].

1.2.2 Structure protéique

Très conservées au cours de l'évolution, les protéines de la famille des nétrines peuvent se trouver sous différentes formes au sein du règne animal (**Figure 2**). En effet, si les invertébrés n'expriment les nétrines que sous leurs formes sécrétées, ce n'est pas le cas des vertébrés chez qui l'on retrouve des formes solubles, nétrine-1, -3, -4 et -5, et d'autres ancrées à la membrane, nétrine-G1 et -G2 qui sont liées à la membrane par une ancre GlycoPhosphatidyInositol (GPI).

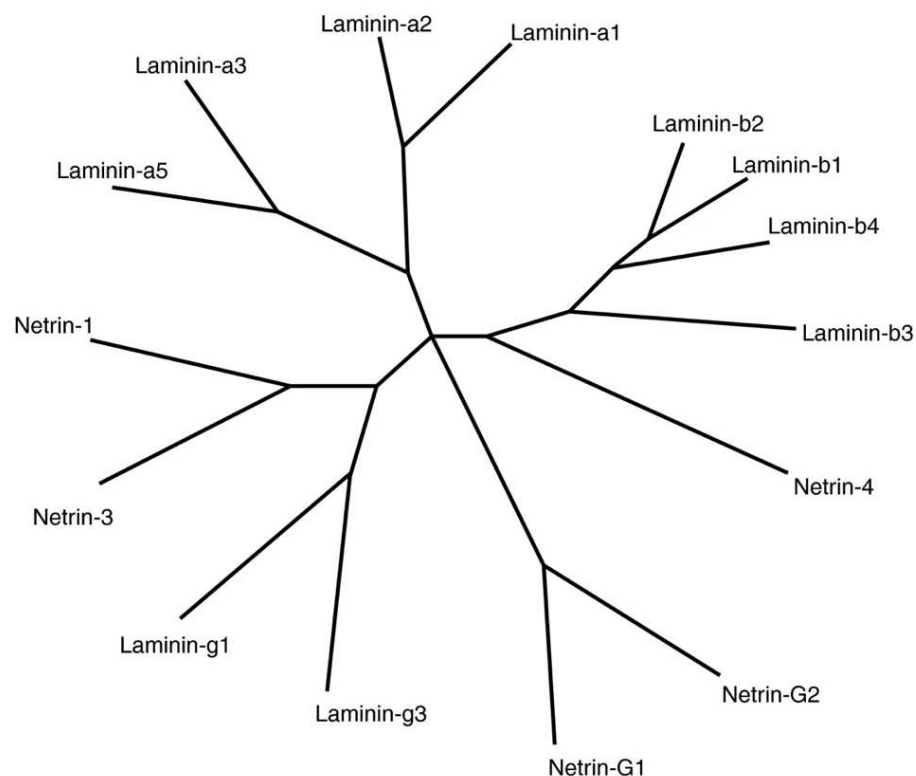


Figure 2 : Arbre phylogénétique des protéines de la famille des nétrines

Tirée de Rajasekharan et Kennedy, 2009 [2]

Appartenant à la superfamille des laminines, les nétrines sont constituées d'environ 600 acides aminés formant des structures protéiques similaires à certaines chaînes des laminines. Ces structures sont organisées en trois domaines majeurs : le domaine laminine VI, le domaine laminine V et le module NÉTRine (NTR) (**Figure 3**).

À l'extrémité N-terminale, on trouve un domaine VI de forme globulaire. Pour les nétrine-1, -3, -G1 et -G2, il est homologue à celui de la chaîne γ 1 des laminines. Dans le cas de nétrine-4, il est homologue à celui de la chaîne β 1 [2]. Ce domaine est absent de la nétrine-5.

S'en suit un domaine central, le domaine V, composé de trois motifs *Epidermal Growth Factor* (EGF) : V1, V2 et V3, à l'exception de nétrine-5 qui n'en compte que deux : V1 et V3 [3]. On retrouve les mêmes homologies avec les chaînes γ 1 et β 1 que pour les domaines VI.

Enfin, à l'extrémité C-terminale, on trouve un domaine spécifique plus large des nétrines appelé « Domaine C » ou NTR. Riche en acides aminés basique et donc chargé positivement, il ne présente pas d'homologie avec des domaines laminines [4]. Pour les nétrines-1 à -4, ce domaine se fixe aux héparines et pourrait jouer un rôle dans leur présentation à la surface des cellules ou leur rétention au sein de la matrice extracellulaire en interagissant avec des protéoglycanes héparane sulfate [5]. Dans les cas de nétrine-G1 et -G2, ce domaine est lié à l'ancre GPI.

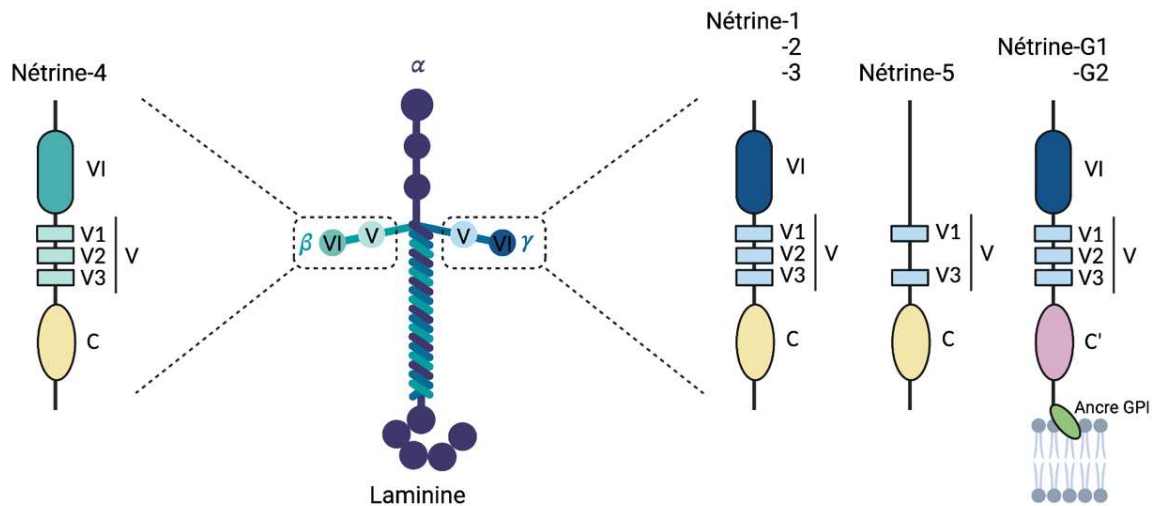


Figure 3 : Structure schématique des nétrines chez les vertébrés

D'après Cirulli and Yebra, 2007 [6]

Grâce à la structure présentée ci-dessus, les nétrines vont pouvoir interagir avec différents récepteurs, formant ainsi des tandems variés permettant un large éventail de fonctions introduit au début de ce chapitre.

1.3 Les récepteurs de nétrine-1

A ce jour, plus d'une dizaine de récepteurs ont été décrits comme interagissant avec nétrine-1. Parmi eux, les principaux appartiennent à la superfamille des immunoglobulines (Ig) et plus précisément à la famille des récepteurs *UNCoordinated-5* (UNC5) comprenant UNC5A, UNC5B, UNC5C et UNC5D et la famille des récepteurs *Deleted in Colorectal Cancer* (DCC), comprenant DCC et Néogénine-1 (Neo-1).

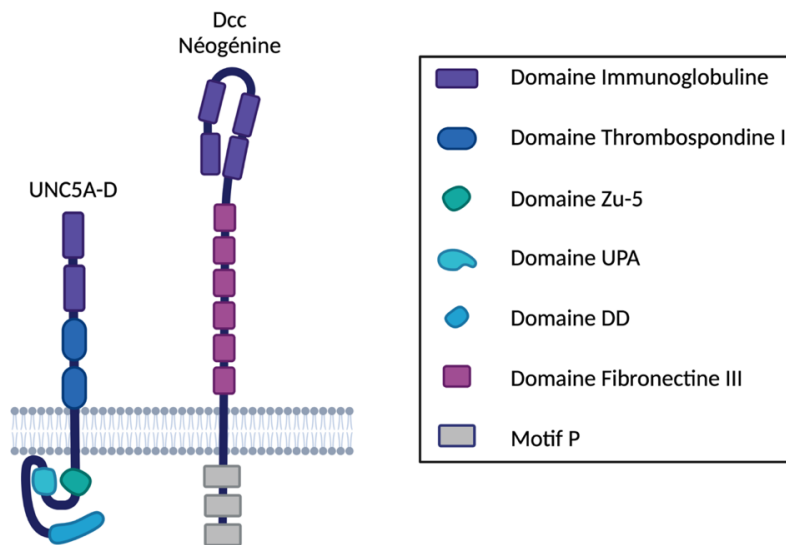


Figure 4 : Structure schématique des principaux récepteurs de nétrine-1

D'après Bellina et Bernet [3]

1.3.1 La famille des récepteurs UNC5

Tout comme nétrine-1, UNC5 a d'abord été identifié chez *C. elegans* comme récepteur de guidage axonal pour la molécule UNC6, orthologue de nétrine-1 [29]. C'est ensuite en 1997 que les homologues mammifères UNC5H1, 2, 3 et 4 et humains UNC5-A, B, C et D furent découverts [7].

Du côté de leur structure, la partie extracellulaire de ces récepteurs se compose de deux domaines ImmunoGlobuline (Ig) et de deux domaines Thrombospondine de type I tandis que la partie cytosolique est caractérisée par trois domaines conservés distincts : le domaine *Zona-occludens/unc-5 homology domain* (Zu-5) homologue aux jonctions intercellulaires Zona Occludens 1, le domaine *Unc-Pidd-Ankyrins* (UPA) homologue aux protéines Pidd et Ankyrins et contenant lui-même une séquence DCC-Binding permettant l'interaction avec le domaine P3 de DCC, et enfin le domaine de mort *Death Domain* (DD) homologue à celui de la famille des récepteurs TNF. La fixation des nétrines à leur récepteurs UNC5 se fait via les domaines laminines des nétrines et les domaines Ig de l'extrémité N-terminale des récepteurs UNC5 [8].

Les récepteurs UNC5 interagissent avec des ligands autres que nétrine-1 tels que nétrine-3 [9], Robo4 [10], draxine [11] et FLRT2/3 [12].

1.3.2 La famille des récepteurs DCC

1.3.2.1 Le récepteur DCC

La première description du récepteur DCC a été faite chez l'Homme en 1990 où il a été identifié par Fearon *et al.* comme un potentiel suppresseur de tumeur [13]. Par la suite, il a également été caractérisé comme étant un médiateur clé au sein du système nerveux central où il joue, entre autres, un rôle dans le guidage axonal [14]–[16], la migration cellulaire [17], [18], la formation et la plasticité des synapses [19] ou encore la maintenance de la myéline [20]. C'est un récepteur transmembranaire qui est fortement exprimé au cours du développement de l'embryon [15], [21], [22] et également chez l'adulte [13], [23].

DCC est une glycoprotéine membranaire d'environ 180 kDa. Son domaine extracellulaire se compose de quatre domaines de types Ig suivi de six domaines Fibronectine III (FNIII) tandis que le domaine intracellulaire se compose de trois séquences très conservées appelées motifs P1, P2 et P3 qui sont indispensables pour sa signalisation. C'est au niveau des domaines FNIII que se fait la liaison avec nétrine-1, entraînant l'activation de la cascade cellulaire associée [24]. Le domaine intracellulaire serait, quant à lui, responsable de la dimérisation des récepteurs en réponse à la fixation de nétrine-1 et du recrutement des molécules de signalisation intracellulaire [25]. DCC est également capable de lier d'autres molécules de la famille des nétrines, à savoir nétrine-3 [9] et nétrine-4 [26] mais également des molécules extérieures à cette famille telle que draxine [11] et cerebelline-4 [27].

1.3.2.2 Néogénine

Autre membre de la famille des récepteurs DCC, Neo-1 présente 50% d'homologie avec DCC et lui est structurellement très semblable [28]. Cependant, contrairement à DCC, son ligand principal n'est pas une molécule de la famille des nétrines mais la molécule *Repulsive Guidance Molecule a* (RGMa). Son affinité pour cette dernière est dix fois supérieure à celle qu'il a pour nétrine-1. Lié à nétrine-1, Neo-1 a montré un rôle d'attraction des axones tandis qu'il a un rôle de répulsion lorsqu'il est lié à RGMa [29]. Neo-1 peut également se lier à ces deux molécules en même temps, entraînant ainsi une diminution globale de la signalisation du récepteur [30].

1.3.3 Les autres récepteurs de nétrine-1

D'autres récepteurs à nétrine-1 ont également été décrits dans la littérature. Ces derniers sont schématisés dans la **Figure 5** et détaillés dans la suite de ce paragraphe. Il est à noter que certains sont sujets à controverse dans la communauté scientifique quant à leur réel rôle de récepteur de nétrine-1.

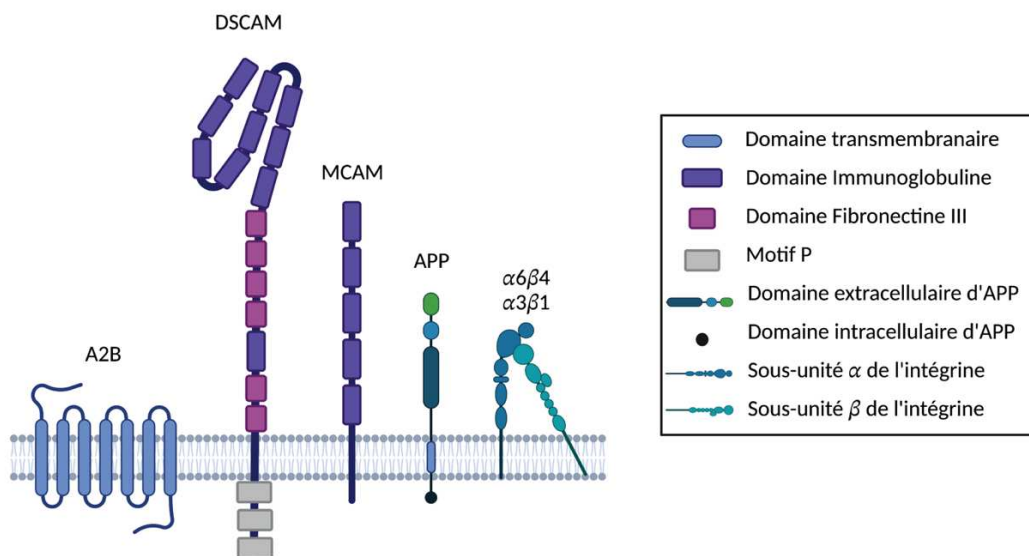


Figure 5 : Structure schématique des autres récepteurs de nétrine-1
D'après Bellina et Bernet [3]

1.3.3.1 Adénosine 2b

Adénosine 2b (A2b) appartient à la famille des récepteurs à adénosine ayant un rôle de modulation du taux d'Adenosine cyclique MonoPhosphate (AMPC) intracellulaire, un élément clé dans le guidage axonal [31]. Récepteur couplé aux protéines G, il interagirait avec DCC afin de stimuler la croissance axonale via la production d'AMPC [32].

Cependant, son rôle comme récepteur de nétrine-1 reste controversé. En effet, Stein *et al.* ont montré chez le rat et un amphibien, *Xenopus laevis*, que l'adénosine 2b (A2b) n'est pas nécessaire au guidage axonal médié par nétrine-1 [25] de même que McKenna *et al.* ont décrit un rôle de régulation de l'expression d'UNC5A par A2b mais une absence d'interaction nétrine-1/A2b [33]. A contrario, Mirakaj *et al.* ont apporté des preuves solides d'une interaction entre nétrine-1 et A2b dans un contexte d'inhibition de l'inflammation [34].

1.3.3.2 Down Syndrome Cell Adhesion Molecule

Down Syndrome Cell Adhesion Molecule (DSCAM) est également un récepteur transmembranaire de type I possédant dix domaines Ig et six domaines FNIII. Décrit comme étant exprimé dans les axones des neurones commissuraux, il a également un rôle de guidage axonal lors de son interaction avec nétrine-1 [35]–[37].

Cependant, comme pour A2b, ce rôle est débattu dans la communauté scientifique, Palmesino *et al.* ayant montré une absence de défaut de guidage des axones commissuraux dans un modèle murin délété de DSCAM [38]. Par ailleurs, aucune voie de signalisation mettant en jeu ce couple n'a pour l'instant été décrite dans la littérature.

1.3.3.3 Melanoma Cell Adhesion Molecule

Également connue sous le nom de *Cluster of Differentiation 146* (CD146) ou Mucine-18, *Melanoma Cell Adhesion Molecule* (MCAM) est une protéine endothéliale transmembranaire exprimée au cours du développement et jouant également un rôle dans l'angiogenèse tumorale via une fonction de co-récepteur à *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) [39]. Sa structure est similaire à celle des autres récepteurs de nétrine-1 avec un domaine extracellulaire comprenant cinq domaines Ig, un domaine transmembranaire unique et une queue cytoplasmique plus ou moins longue. MCAM existe sous trois formes : une forme longue, une forme courte et une forme soluble. Les formes longue et courte diffèrent par la nature (et donc la longueur) de leur queue cytoplasmique tandis que la forme soluble correspond à la partie extracellulaire seule après action de métalloprotéinases sur les formes membranaires [40].

La fonction de récepteur de nétrine-1 ne lui a été attribuée que récemment, en 2015, par Tu *et al.* Ces derniers ont montré que cette interaction, plus forte que celle observée dans le couple nétrine-1/UNC5B, est nécessaire à l'angiogenèse au cours du développement chez la souris et le zebrafish [41].

1.3.3.4 Protéine précurseur β -Amyloid

Récepteur transmembranaire de type I, la structure de la Protéine Précurseure β -Amyloid (APP) se compose d'un domaine extracellulaire avec un domaine Kunitz Type Protease Inhibitor, un domaine transmembranaire unique et un petit domaine intracellulaire.

La fonction physiologique d'APP et des protéines de sa famille est encore peu connue. Au cours du développement, APP interagit avec DCC en présence de nétrine-1 et amplifie sa signalisation intracellulaire, participant ainsi à la croissance et au guidage des axones commissuraux [42]. La relation nétrine-1/APP a également montré un intérêt dans le cadre de la maladie d'Alzheimer décrite dans le paragraphe **1.4.3.2.4.1** de ce manuscrit.

1.3.3.5 Intégrines $\alpha6\beta4$ et $\alpha3\beta1$

Les intégrines sont des hétérodimères transmembranaires, d'environ 250 kDa, composés d'une sous-unité α et une sous-unité β . Le rôle des intégrines $\alpha6\beta4$ et $\alpha3\beta1$ comme récepteur de nétrine-1 a été mis en évidence dans le pancréas [43]. Contrairement aux autres récepteurs, ces intégrines interagissent avec nétrine-1 via son domaine C, permettant ainsi le contrôle de la migration et de l'adhésion cellulaire des cellules progénitrices épithéliales du pancréas. Cette interaction et les voies de signalisation impliquées restent très peu documentées à ce jour.

1.4 Les différents rôles de nétrine-1

Initialement décrite comme une molécule de guidage, nétrine-1 possède de nombreux rôles que cela soit au cours du développement mais également chez l'adulte. Cependant, la signalisation qu'elle induit a été la plus étudiée dans le développement embryonnaire et nécessite encore d'être approfondie en dehors de celui-ci. Dans la suite de ce paragraphe, nous verrons une liste non exhaustive des différents rôles de nétrine-1 et éventuellement de sa signalisation lorsque cette dernière est connue.

1.4.1 Un rôle charnière comme ligand prototypique des récepteurs à dépendance

La vision classique du fonctionnement d'un récepteur est relativement simple : un ligand se lie à son récepteur et induit une cascade de signalisation engendrant l'activation de plusieurs mécanismes impliqués dans la vie de la cellule comme la migration, la différenciation, la modulation du métabolisme ou encore la mort cellulaire. En absence de ligand, les récepteurs restent inactifs et n'influencent donc pas le devenir de la cellule. Cependant, en 1998, les Docteurs Patrick Mehlen et Dale Bredesen complexifient cette vision en définissant le concept des Récepteurs à Dépendance (RD) à travers leurs travaux sur DCC [44]. Pour ces récepteurs, la fixation du ligand entraîne un signal positif de survie ou encore de migration cellulaire. En revanche, en son absence, c'est un signal pro-apoptotique, dit signal négatif, qui est transmis, entraînant la mort de la cellule. Les cellules portant ces récepteurs sont donc dépendantes de la présence de ligand pour survivre (**Figure 6**). Ainsi, contrairement aux autres récepteurs qui fonctionnent selon un mode « on/off » dépendant de la fixation de leur ligand, les RD induisent en permanence un signal et fonctionnent donc selon un mode « on/on ». Cette dualité de fonction explique les rôles clés que jouent ces récepteurs au cours du développement mais également chez l'adulte comme cela va être présenté par la suite.

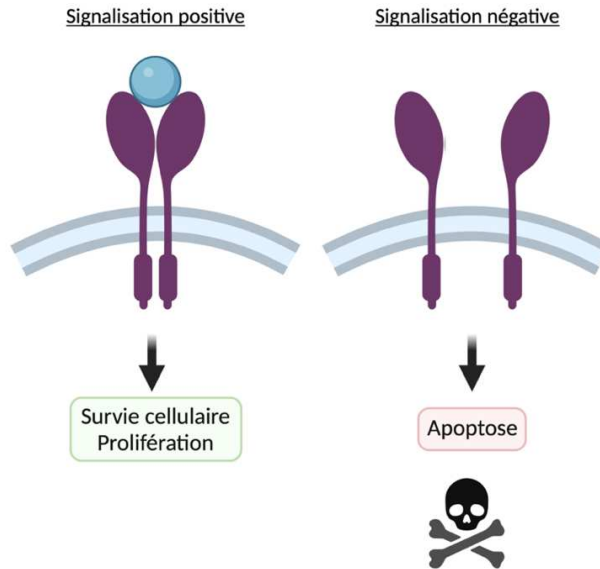


Figure 6 : Représentation schématique du principe des récepteurs à dépendance

Dans les RD, la signalisation positive est activée par la fixation du ligand sur son récepteur et aboutie à des signaux de survie et de prolifération. En l'absence de fixation du ligand, les récepteurs induisent un signal d'activation de l'apoptose.

Plus de vingt ans après l'établissement de ce concept, la famille des RD compte à ce jour une vingtaine de membres (Erreur ! Référence non valide pour un signet.). Parmi eux, on trouve entre autres :

- Les récepteurs de nétrine-1 : DCC, Neo-1 et UNC5A-D [44]–[47].
- Les récepteurs au morphogène *Sonic Hedgehog* (SHH) : Patched et Cell-adhesion Moleculerated/Downregulated by Oncogenes [48], [49].
- Le récepteur aux neurotrophines p75 NeuroTrophin Receptor [50].
- Les récepteurs à activité tyrosine kinase : Rearranged During Transfection, Tropomyosin Receptor Kinase A et C, Ephrin type A receptor 4, MET ou encore c-Kit [51]–[56].
- Le récepteur à Sémaphorine-3E : Plexin D1 [57].
- Les intégrines $\alpha5\beta3$ et $\alpha5\beta1$ [58].
- Le récepteur Kremen1 [59].
- Le récepteur Notch3 [60].

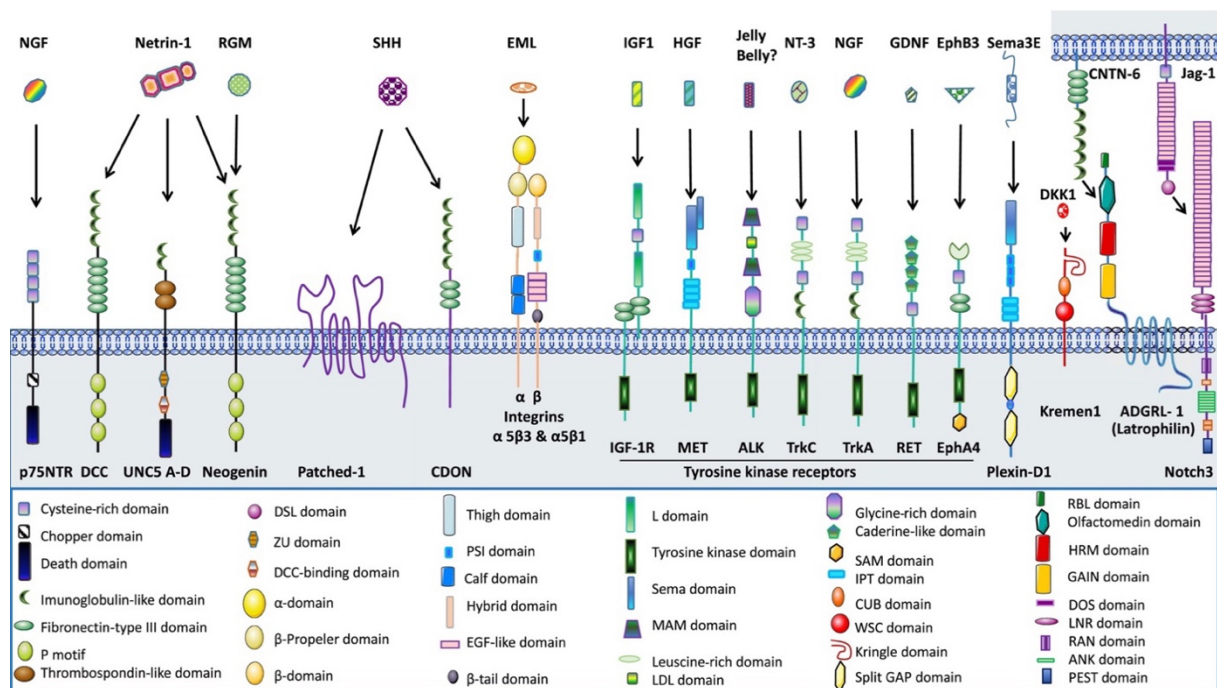


Figure 7 : La famille des récepteurs à dépendance

Figure de Negulescu et Mehlen, 2018 [61]

Aucune homologie de structure n'est observée entre les différents membres de cette famille de RD (**Figure 7**). En revanche, ils possèdent une homologie fonctionnelle puisque tous ses membres possèdent la dualité de fonction caractéristique des RD. Dans la suite de ce manuscrit, nous allons nous concentrer sur les couples ligand/récepteur que forme nétrine-1 avec UNC5B/DCC.

1.4.1.1 L'absence de nétrine-1 : permis de tuer

Jusqu'à présent, tous les RD ont montré une induction de la mort cellulaire via l'apoptose. En plus d'une localisation précise au sein des radeaux lipidiques sur laquelle nous reviendrons, l'état d'oligomérisation des récepteurs DCC et UNC5-B est très important. Effectivement, il a été montré par Mille *et al.* que la cascade apoptotique ne pourra se déclencher que lorsque les récepteurs sont sous forme de monomère [62]. Comme nous le verrons plus tard dans ce chapitre, la monomérisation des récepteurs ne se fait qu'en l'absence de nétrine-1.

1.4.1.1.1 Une localisation clé

La transduction d'un signal via DCC et UNC5-B, qu'il s'agisse d'un signal positif ou négatif, est régit par une condition *sine qua non*. Cet élément clé est leur localisation au sein de micro-domaines membranaires appelés radeaux lipidiques qui a été décrite comme leur étant essentielle par plusieurs équipes et dans plusieurs contextes [63]–[66]. Cette localisation particulière semble être liée à la palmitoylation des récepteurs qui, en revanche, ne semble pas dépendante de la présence ou non de nétrine-1. Toutefois, des études sont encore nécessaires pour vérifier cette nécessité pour les autres RD.

1.4.1.1.2 *Modus operandi* d'UNC5-B

La signalisation pro-apoptotique d'UNC5-B est à ce jour mieux connue que celle de DCC. Des études cristallographiques ont montré que la multimérisation d'UNC5-B induit des changements structuraux dans le domaine intracellulaire qui se retrouve alors stabilisé dans une configuration fermée au sein de laquelle la région DD interagit avec Zu-5 [67]. Dans une telle configuration, la partie intracellulaire n'est pas sensible à un clivage protéolytique.

En configuration ouverte, en revanche, le domaine cytoplasmique va être clivé par la caspase 3 au niveau de l'acide aspartique D412, c'est-à-dire en N-terminal du domaine Zu-5. Pour UNC5-B, ce site de clivage est unique. A la suite de cette protéolyse, un fragment composé des domaines Zu-5, UPA et DD est libéré et déclenche une cascade de réactions à l'aide de partenaires pro-apoptotiques pour aboutir *in fine* à la mort de la cellule. Il est important de noter que ces partenaires diffèrent en fonction du récepteur UNC5 impliqué, expliquant ainsi des modalités d'induction différentes de l'apoptose en fonction du RD impliqué. Dans le cas d'UNC5-B, c'est la *Death Associated Protein Kinase* (DAPK) qui va jouer un rôle clé.

DAPK est un partenaire majeur d'UNC5-B avec qui elle est capable d'interagir indépendamment de la présence de nétrine-1. En configuration fermée, UNC5-B interagit avec DAPK d'une part et la protéine *Cancerous Inhibitor of PP2A* (CIP2A) d'autre part. DAPK se trouve alors sous forme phosphorylée inactive par son activité sérine-thréonine kinase d'autophosphorylation. Lorsque le fragment intracellulaire est libéré dans le cytoplasme à la suite du clivage protéolytique d'UNC5-B monomérique, il y a une perte de l'association avec CIP2A. Cette perte permet alors l'action de *Protein Phosphatase 2A* (PP2A) qui va activer DAPK en la déphosphorylant [68], [69]. Les protéines effectrices en aval de DAPK ne sont pas encore bien évidentes mais DAPK est cependant connue pour induire la mort cellulaire via des mécanismes dépendant et indépendant de p53. L'ensemble de ce mécanisme est schématisé dans la **Figure 8**.

Les travaux de thèse récemment réalisés par le Dr. Ambroise Manceau au sein du laboratoire du Dr. Patrick Mehlen ont également permis de préciser les mécanismes conduisant à l'apoptose via UNC5-B [70]. Ils impliquent l'activation de *Copper Metabolism Murr1 Domain Containing 2* (COMM2), une protéine cytoplasmique contenant un domaine COMM en position C-terminal qui permet les interactions « protéine-protéine ». Cette dernière va alors interagir avec Cullin-RING-Ligase 3, un complexe de protéines E3 ubiquitine ligase, permettant ainsi l'ubiquitination, et donc la dégradation par le protéasome, de *Myeloid Cell Leukemia-1* (Mcl-1), une protéine anti-apoptotique. Le déséquilibre de la balance pro- et anti-apoptotique conduit alors à une mort de la cellule.

Ces différentes études identifient plusieurs mécanismes semblant être activés par l'interaction nétrine-1/UNC5-B. Des recherches additionnelles sont encore nécessaires afin de compléter ces connaissances et également de pouvoir mettre en avant un quelconque lien entre ces différentes signalisations.

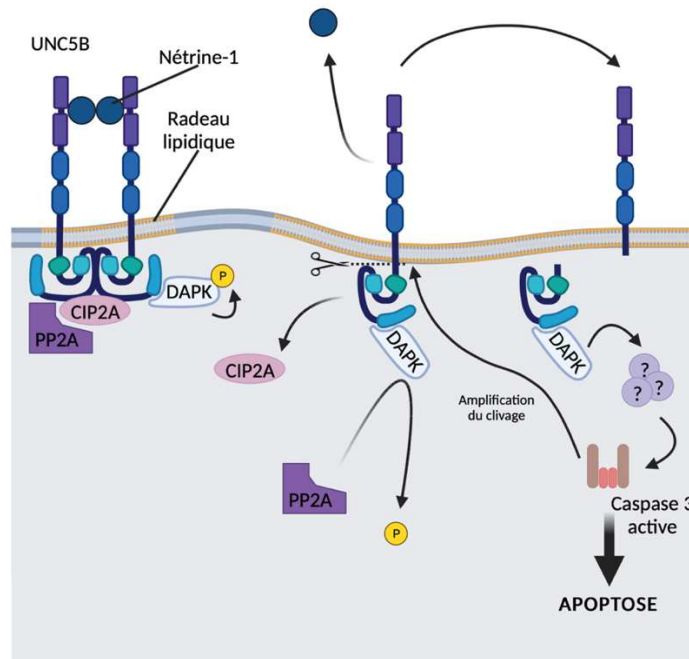


Figure 8 : Voies de signalisations négatives induites par UNC5B

En présence de nétrine-1, on observe une dimérisation des récepteurs UNC5-B localisés au niveau des radeaux lipidiques. Les récepteurs ont alors une configuration fermée et ne sont pas sensibles à la protéolyse. En l'absence de nétrine-1, UNC5-B se monomérisent et adoptent une configuration ouverte. La partie intracellulaire est alors clivée, l'interaction avec CIP2A est perdue et PP2A va pouvoir déphosphoryler DAPK qui devient alors active. Cette activation aboutit à l'apoptose de la cellule.

1.4.1.1.3 Modus operandi de DCC

La signalisation pro-apoptotique induite par DCC n'est, à ce jour, pas encore totalement établie. Cependant, il a été démontré qu'elle n'implique pas la voie des récepteurs de mort, voie qui permet le recrutement de la caspase-8 puis son activation autour d'un complexe appelé Death-Inducing Signaling Complex. La voie mitochondriale dans laquelle on observe un relargage de cytochrome-c permettant le recrutement et l'activation de la caspase-9 ne joue également aucun rôle dans le contexte de DCC [71].

Sous forme multimérique, la partie intracellulaire de DCC est associée à la procaspase-3, *i-e* la forme non clivée et donc inactive d'une caspase. Cependant, plusieurs équipes ont décrit une activité basale très faible de ce zymogène de la caspase-3 et il est possible que la multimérisation de DCC empêche cette activité [72]. En absence de nétrine-1, la monomérisation de DCC permettrait alors un autoclivage de la procaspase-3 et son activation en caspase effectrice. Cette dernière serait alors responsable de la protéolyse du domaine intracellulaire de DCC au niveau de l'acide aspartique D1290 entraînant l'exposition d'un domaine pro-apoptotique appelé *Addiction Dependence Domain* (ADD) [44]. ADD va alors servir au recrutement d'un partenaire pro-apoptotique clé : *DCC-Interacting Protein 13- α* (DIP13 α) [73]. Cette dernière serait la protéine adaptatrice permettant le recrutement et l'activation d'autres partenaires pro-apoptotiques tels que la caspase-9 (via une deuxième protéine adaptatrice inconnue), ou la procaspase-3 libre ou liée à des monomères de DCC encore non clivés. Ce complexe assurerait alors une boucle d'amplification des caspases aboutissant à la mort de la cellule. Cette signalisation hypothétique est décrite dans la **Figure 9** et nécessite encore des travaux de recherche complémentaires pour être validée.

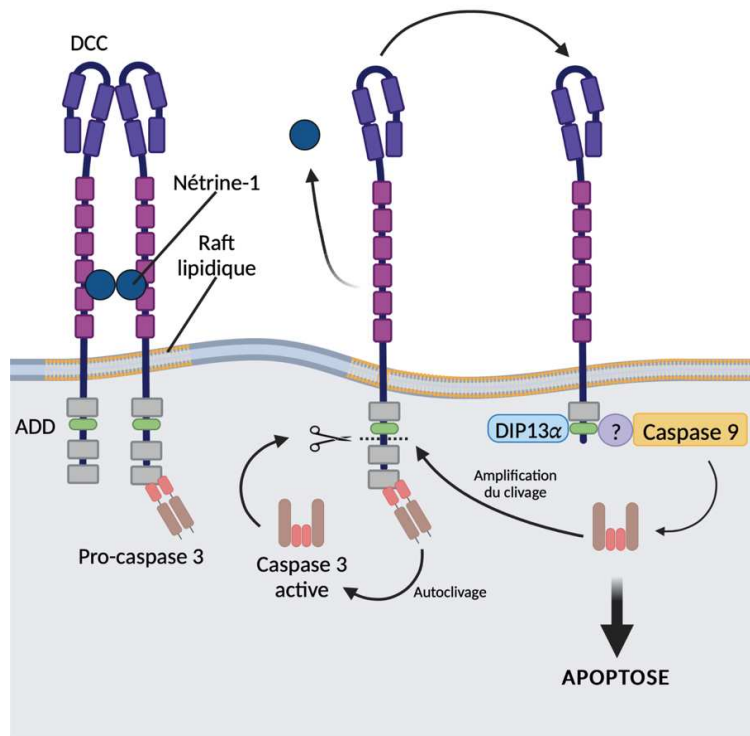


Figure 9 : Voie de signalisation négative potentielle de DCC

En présence de nétrine-1, les récepteurs DCC localisés au niveau de rafts lipidiques sont dimérisés. La pro-caspase 3 est liée à l'extrémité cytosolique du récepteur. En l'absence de nétrine-1, la partie cytosolique de DCC monomérique est clivée, permettant ainsi une activation de la caspase 3 qui est libérée dans le cytoplasme. Le clivage intracellulaire permet l'exposition du domaine ADD qui va alors recruter DIP13 α aboutissant à l'activation de la caspase 9 et à l'apoptose de la cellule

1.4.1.2 La présence de nétrine-1 : mourir peut attendre

La présence de nétrine-1 est associée à l'induction de signaux positifs divers aux conséquences multiples. Ces signaux dépendent notamment de la nature des cellules et du contexte cellulaire dans lequel elles se trouvent. Les nombreuses voies de signalisation induites par la fixation de nétrine-1 chez l'Homme ne seront pas décrites en détail dans ce manuscrit. Cependant nous verrons dans la suite de ce chapitre le rôle global de nétrine-1 dans des contextes physiologique et pathologique.

1.4.2 Nétrine-1 au cours du développement : un rôle physiologique

1.4.2.1 Un rôle de guide

Au cours du développement, nétrine-1 est décrite comme une protéine bifonctionnelle exerçant une activité de chimiorépulsion ou de chimioattraction de l'extrémité axonale, selon le contexte cellulaire dans lequel les deux se rencontrent. Parmi les facteurs influençant l'un ou l'autre de ces effets, on trouve notamment la composition en récepteurs à la surface du cône de croissance. Pour rappel, le cône de croissance est une structure spécialisée se

trouvant à l'extrémité des axones et qui sonde l'environnement à la recherche des molécules de guidage permettant de l'orienter vers sa cible.

La première étape de la signalisation implique une dimérisation des récepteurs, il peut s'agir d'une homodimérisation ou d'une hétérodimérisation. Dans le cas d'une homodimérisation DCC/DCC, nétrine-1 a une fonction de chimioattraction tandis qu'elle a une fonction de chimiorépulsion à courte et à longue distance dans le cas respectivement d'une dimérisation UNC5/UNC5 et DCC/UNC5 [74]. Le cône de croissance guiderait alors l'axone en suivant un gradient soluble de nétrine-1 à qui on décrit alors une activité chimiotactique.

Une fois nétrine-1 fixée et les récepteurs dimérisés, ils forment une plateforme clé pour le recrutement de diverses protéines permettant une signalisation en aval via la voie des Rho GTPases, la voie des *Mitogen-Activated Protein Kinases* (MAPK) mais également une implication dans la modulation du taux intracellulaire de seconds messagers tel que le calcium permettant ainsi un remodelage du cytosquelette. Elle permet aussi une régulation locale de la traduction [75].

La synergie de ces différents effets permet d'assurer la motilité correcte du cône de croissance vers sa cible, en adéquation avec le rôle d'attraction ou de répulsion défini par les récepteurs impliqués. L'effet est d'autant plus potentialisé que nétrine-1 est capable d'associer plusieurs dimères de récepteurs, on peut alors parler de multimérisation des récepteurs [75].

Cependant, le rôle de nétrine-1 dans le guidage axonal a été redéfini en 2017 par plusieurs équipes qui ont montré qu'elle n'a pas une activité chimiotactique selon un gradient de protéine soluble mais une activité haptotactique, c'est-à-dire que le chimioattractant, ici nétrine-1, est fixé à une surface et n'est donc pas soluble. De plus, il semble que nétrine-1 est en fait produite par deux régions différentes : la plaque du plancher et la zone ventriculaire, et qu'elle agit différemment en fonction de sa zone de production [76]–[78].

Le mode de fonctionnement de nétrine-1 requiert donc des ajustements afin d'inclure ces nouvelles données. Une hypothèse est que nétrine-1 soit une molécule d'adhérence entre les cellules exprimant ses récepteurs et la matrice extracellulaire. Les axones peuvent alors localement se coller et se décoller en fonction de la présence de nétrine-1 ce qui, en association avec les mouvements du cytosquelette, permet la migration de l'axone le long du gradient de nétrine-1 [79].

1.4.2.2 Un rôle dans la morphogénèse des organes branchés

Au cours du développement, nétrine-1 est détectée en dehors du système nerveux et plus précisément au sein d'organes présentant une structure dite branchée tels que le poumon, le pancréas ou encore la glande mammaire [43], [80], [81]. Ces organes ont en commun un mécanisme de morphogénèse faisant intervenir des phases successives de bourgeonnements et de branchements à partir d'une structure épithéliale tubulaire et/ou canalaire [6].

Brièvement, dans la morphogénèse pulmonaire, nétrine-1 associée à nétrine-4 empêche la formation de bourgeons et de ramifications ectopiques via un mécanisme ne passant pas par DCC [80]. Dans la morphogénèse du pancréas, nétrine-1 participerait à la composition d'une matrice extracellulaire propice à l'adhésion des cellules épithéliales mais également à la migration de certaines cellules progénitrices du pancréas. Dans ce cas, ce sont les intégrines $\alpha6\beta4$ et $\alpha3\beta1$ qui seraient impliquées comme récepteur de nétrine-1 [43]. Enfin, la morphogénèse de la glande mammaire, qui a lieu tardivement au moment de la puberté,

nécessiterait l'interaction entre nétrine-1 et son récepteur Neo-1. Cette interaction permet la cohésion des deux couches cellulaires, la couche cellulaire unique externe appelée « cap cells » et les cellules épithéliales préliminales bordant la lumière interne, formant le bourgeon terminal à l'extrémité des canaux en élongation [81].

Ainsi, au sein de la morphogenèse, on retrouve différents rôles de nétrine-1 mais principalement un rôle comme molécule d'adhésion plutôt que celui de molécule de guidage.

1.4.2.3 Un rôle dans l'angiogenèse

L'angiogenèse désigne le processus de croissance de nouveaux vaisseaux à partir de capillaires préexistants ainsi que leur survie au cours du développement embryonnaire et fœtal dans un contexte normal. Elle est régulée par plusieurs facteurs qui peuvent être pro- ou anti-angiogéniques. Parmi ces facteurs on trouve beaucoup de partenaires moléculaires initialement décrits dans la mise en place du système nerveux comme nétrine-1. Si nétrine-1 semble bien impliquée dans la régulation de l'angiogenèse, son rôle pro- ou anti-angiogénique est encore débattu.

En effet, nétrine-1 de par sa capacité à promouvoir la prolifération, la migration, l'adhésion des cellules endothéliales ainsi que d'induire le bourgeonnement et le branchement vasculaire est décrite comme jouant un rôle pro-angiogénique [102]–[104]. Cependant, certaines études ont démontré un rôle anti-angiogénique où nétrine-1 inhibe la migration des cellules endothéliales et la formation de nouveaux vaisseaux [105], [106]. Ces effets antagonistes peuvent s'expliquer par l'utilisation de doses considérablement différentes de nétrine-1 comme souligné par les Dr. Castets et Mehlen [11]. Des recherches plus poussées sont nécessaires afin de déterminer les concentrations à utiliser *in vitro* pour que nétrine-1 exerce ses fonctions physiologiques.

1.4.2.4 Un rôle de maintien de la pluripotence

Un rôle de nétrine-1 dans le maintien de la pluripotence cellulaire a été décrit une première fois en 2015 par Ozmadenci *et al.* [82]. Ces derniers ont décrit nétrine-1 comme une molécule de modulation de la reprogrammation cellulaire. En effet, l'ajout de nétrine-1 permet d'améliorer la génération de cellules Souches Pluripotentes induites (iPS) à partir de cellules différenciées en limitant l'apoptose. Nétrine-1 aurait donc un rôle de protection des cellules souches multipotentes en adéquation avec son rôle de ligand des RD décrit dans le paragraphe **1.4.1**.

Récemment Huyghe *et al.* ont montré dans des Cellules Souches Embryonnaires murines (mESCs) que nétrine-1 contrôle la pluripotence de ces cellules via une modulation des voies Wnt et MAPK [83]. Ce nouveau rôle de nétrine-1 passe par ses récepteurs UNC5-B et Neo-1 qui agissent en synergie. Un défaut de signalisation de l'un ou l'autre entraînant une perte de la pluripotence des mESCs. Cependant, les auteurs ont également montré que la stœchiométrie des récepteurs joue un rôle très important. Ainsi, nétrine-1 promeut la pluripotence des mESCs en activant la voie Wnt, impliquée dans le maintien des propriétés souches, et en diminuant la voie des MAPK, impliquée dans la différenciation des cellules via Neo-1 et UNC5-B. Cependant, bien que UNC5-B soit nécessaire à la répression de la voie des MAPK, une augmentation de la proportion d'UNC5-B par rapport à Neo-1 est associée à une activation de cette voie et une différenciation des mESCs. Ces expériences témoignent de

nouveau du large éventail de fonctions de nétrine-1 en association avec son répertoire de récepteurs.

1.4.3 *Nétrine-1 chez l'adulte : un rôle pathologique*

1.4.3.1 Expression de nétrine-1 et de ses principaux récepteurs dans les tissus sains adultes

Comme nous venons de le voir, le rôle de nétrine-1 et de ses récepteurs est prépondérant dans le développement et leurs taux d'expression y sont élevés. Cependant, cette expression est bien différente chez l'adulte.

« *The Human Protein Atlas* » est un programme suédois lancé en 2003 dont le but est de recenser toutes les protéines humaines dans les cellules, les tissus et les organes en utilisant diverses technologies omiques. Les distributions de nétrine-1 et ses récepteurs UNC5-B, DCC et Néo-1 dans les principaux tissus et organes du corps humain sont décrites dans la [Erreur ! Source du renvoi introuvable.](#) ci-dessous. Ainsi, on constate que l'expression de nétrine-1 et DCC est relativement limitée dans les tissus sains adultes. En revanche UNC5-B et Néo-1 sont exprimés de façon ubiquitaire.

Un des rôles supposés de nétrine-1 dans ce contexte sain pourrait-être la protection des tissus contre une prolifération excessive : une division cellulaire excessive et incontrôlée conduirait en effet à l'impossibilité pour nétrine-1 de se fixer à ses récepteurs dont le nombre serait alors trop important. Cette absence de liaison de la protéine entraînerait alors l'apoptose des cellules surnuméraires [3].



Figure 10 : Expression de nétrine-1 et de ses récepteurs dans les tissus humains adultes sains
 Tirée de « The Human Protein Atlas »

(nTPM) : Expression normalisée de données issues de deux sources différentes (HPA et GTEx)

(Score) : Expression basée sur les coupes immunohistochimiques de la base de données The Human Protein Atlas

1.4.3.2 Nétrine-1 et ses récepteurs dans différents contextes pathologiques

L'expression de nétrine-1 et ses principaux récepteurs est cependant altérée dans différents contextes pathologiques comme nous allons le voir dans la suite de ce paragraphe.

1.4.3.2.1 Nétrine-1 & Cancers

Il est à présent bien connu que les cellules cancéreuses développent un certain nombre de stratégies d'échappement afin d'assurer leur survie. Dans le contexte des récepteurs à dépendance, trois mécanismes ont été décrits (**Figure 11**) : 1-une perte de l'expression des RD 2-une altération des partenaires pro-apoptotiques 3-une surexpression du ligand qui agit de façon autocrine. De façon intéressante, on note que l'altération des partenaires pro-apoptotiques principalement décrite est une diminution de l'expression de DAPK (cf. **1.4.1.1.2**) via une hyperméthylation de son gène. Cette diminution est quasiment systématiquement associée à une diminution de l'expression de nétrine-1, également due à une hyperméthylation de son promoteur [8], [84].

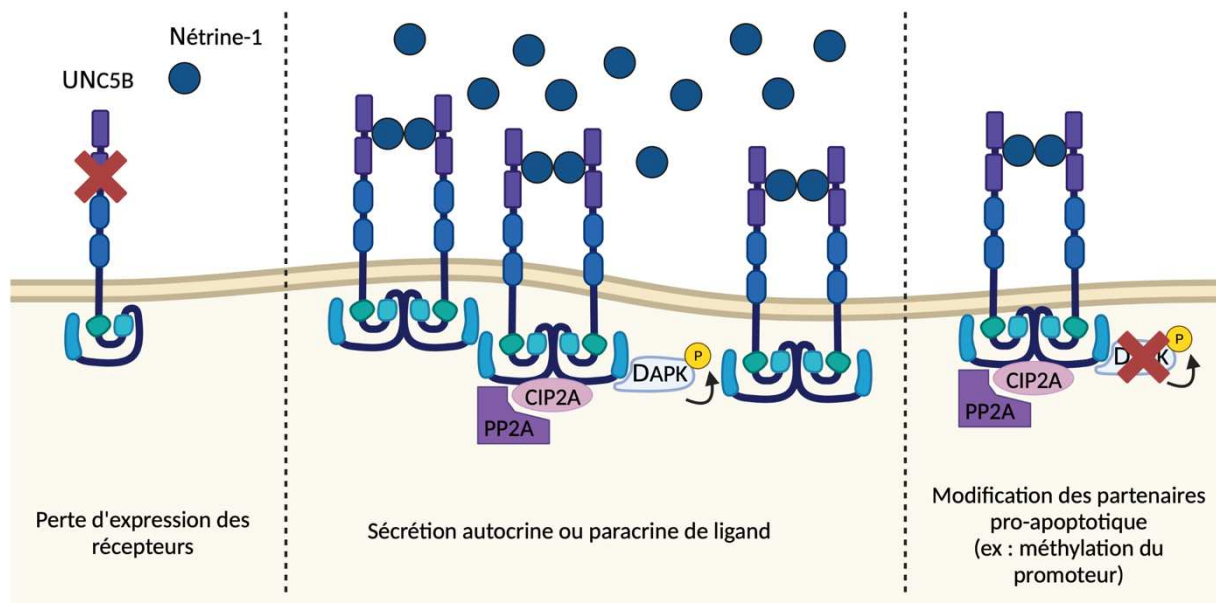


Figure 11 : Mécanismes d'échappement des cellules tumorales à la signalisation des récepteurs à dépendance

Trois mécanismes d'échappement ont été décrits pour échapper à la mort cellulaire induite par les récepteurs à dépendance : la perte d'expression des récepteurs, la sécrétion autocrine ou paracrine de ligand et la modification des partenaires pro-apoptotiques.

Ainsi, l'expression des RD est souvent diminuée dans les cancers voire même absente. DCC a été nommé ainsi suite à sa diminution/disparition dans la majorité des carcinomes colorectaux [35] et la méthylation du gène UNC5-C a été observée également dans les cancers colorectaux entraînant également sa diminution/disparition [107]. UNC5-B est également régulé négativement dans différents cancers tels que les cancers du sein, de l'estomac, du poumon, de l'utérus, du rein et colorectaux [108]. Cela a d'ailleurs conduit à l'hypothèse que les RD pourraient être des répresseurs de tumeurs en conduisant à la mort des cellules surnuméraires dans un environnement où le ligand serait limitant.

A contrario des RD, une surexpression de nétrine-1 est retrouvée dans un grand nombre de cancers, comme il est exposé dans la **Figure 12**. Dans un tel contexte c'est la survie des cellules surnuméraires, et donc cancéreuses, qui est favorisée.

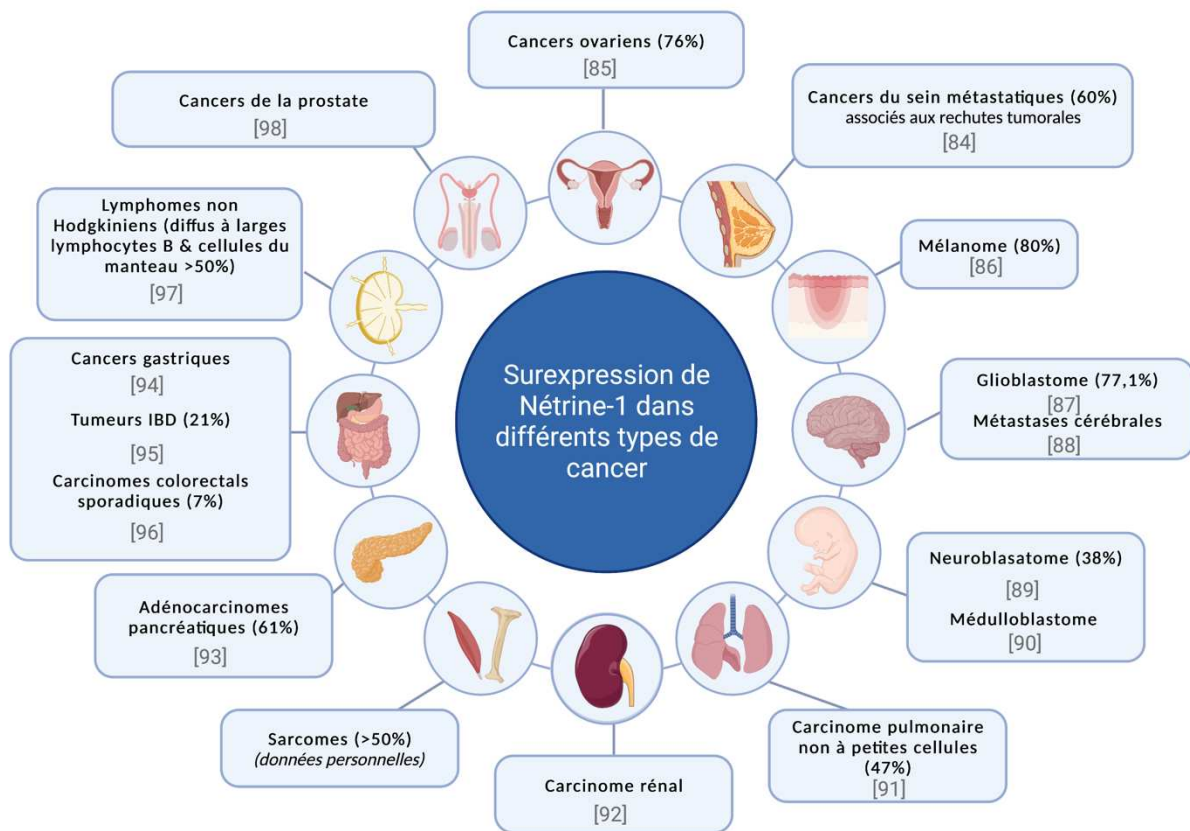


Figure 12 : Surexpression de netrin-1 dans les cancers

Favorable à la prolifération des cellules cancéreuses, c'est en réfléchissant à une stratégie pour limiter la disponibilité de nétrine-1 dans les tumeurs qu'a émergé l'idée de développer un anticorps thérapeutique dirigé contre cette cible. Ce dernier, le NP137, vous est présenté dans le chapitre **1.5** de ce manuscrit.

Outre un rôle dans la survie des cellules cancéreuses, des travaux du laboratoire ont permis la mise en évidence d'un rôle de nétrine-1 dans la plasticité cellulaire des cellules cancéreuses et notamment sur le phénomène de Transition Epithélio-Mésenchymateuse (EMT). Ces travaux ont montré une épithélialisation de certaines tumeurs traitées avec le NP137 [99], [100]. Cette propriété est intéressante dans un contexte oncologique au sein duquel les tumeurs mésenchymateuses sont généralement plus agressives car plus résistantes aux traitements et plus enclines à former des métastases [101].

1.4.3.2.2 Nétrine-1 & inflammation

Ces dernières années, plusieurs recherches ont mis en évidence une modulation des processus immunologiques par des molécules de guidage comme nétrine-1 [102]. C'est dans ce contexte qu'un rôle de modulation de l'inflammation par nétrine-1 a été mis en avant par la communauté scientifique.

1.4.3.2.2.1 Un rôle anti-inflammatoire

Le rôle anti-inflammatoire de nétrine-1 a été décrit dans plusieurs pathologies telles que l'insuffisance rénale aiguë [103], la péritonite [34] ou encore dans les lésions d'ischémie-reperfusions [104]. Cet effet passe notamment par l'inhibition de l'infiltration des cellules immunitaires [104], la polarisation des macrophages M0 en macrophages M2 [105] et la réduction de la sécrétion cytokines/chimiokines pro-inflammatoires [106]. Dans les cas d'inflammation aiguë, une hypoxie des tissus peut se mettre en place, déclenchant ainsi l'expression du Facteur 1- α Induit par l'Hypoxie (HIF-1 α) qui permet l'expression de nétrine-1 dans ces conditions [107].

1.4.3.2.2.2 Un rôle pro-inflammatoire

Plus récemment, un rôle pro-inflammatoire de nétrine-1 a également été décrit, notamment dans l'athérosclérose et l'obésité.

Tout d'abord, nous avons vu au début de ce chapitre 1 que NF κ B régule l'expression de nétrine-1 [108](cf. 1.2.1). Or, ce facteur de transcription est connu pour être un des régulateurs de plusieurs gènes codant des protéines de l'inflammation. Ainsi, un contexte inflammatoire permettant l'expression de NF κ B conduirait à l'activation directe de la transcription de nétrine-1 inhibant ainsi le rôle suppresseur de tumeurs des RD et favorisant le développement des tumeurs. Un rôle pro-inflammatoire de nétrine-1 a été décrit dans les cas d'athérosclérose où nétrine-1 entraîne une accumulation des macrophages dans les lésions, promeut leur survie et stimule l'inflammation [109].

Nétrine-1 joue également un rôle dans l'obésité, maladie dans laquelle elle promeut l'inflammation du tissu adipeux en favorisant l'accumulation de macrophages par un blocage de leur migration via UNC5-B [110]. Sharma *et al.* ont montré plus tard que la délétion de nétrine-1 dans un modèle murin obèse permet 1-une adipose moins prononcée 2-une meilleure homéostasie du tissu adipeux, en modifiant notamment les phénotypes des macrophages pour les rendre plus efficaces dans la gestion des lipides, 3-une meilleure sensibilité à l'insuline [111]. Chez l'Homme, une étude récente montre que le niveau de nétrine-1 circulant dans le sang augmente en cas d'obésité et peut diminuer après une perte de poids. Cette augmentation est liée à une augmentation de la régulation du gène de nétrine-1 dans la fraction cellulaire du stroma vasculaire adipeux, contenant notamment les macrophages. De façon intéressante, cette étude montre *in vitro* que les adipocytes stimulent la production de nétrine-1 par les macrophages, via des molécules solubles, qui agit ensuite elle-même sur les adipocytes, augmentant alors la production de molécules associées à l'inflammation. Ici, les auteurs ont mis en lumière un effet de nétrine-1 qui passe par son récepteur Néo-1 [112].

1.4.3.2.3 Nétrine-1 & douleur

D'autres travaux ont également mis en évidence un rôle de nétrine-1 dans la survenue de la douleur associée à certaines maladies.

En effet, à titre d'exemple, Zhu *et al.* ont montré que dans le cas de l'arthrose, les ostéoclastes sécrètent nétrine-1, induisant alors la croissance axonale des nerfs sensoriels, qui est à l'origine des douleurs articulaires caractéristiques de la maladie [113]. Dans leur modèle murin, l'inhibition de nétrine-1 diminue l'innervation sensorielle de l'os sous-chondral et la

douleur. De même, l'utilisation de l'anticorps anti-nétrine-1 NP137 de NETRIS Pharma dans un autre modèle murin d'arthrite, empêchant ainsi l'interaction nétrine-1/récepteur, a montré un effet antalgique [114]. Cet effet antalgique de l'anticorps a également été montré dans un article en cours de publication dans les cas de myélomes multiples, un cancer de la moelle osseuse souvent associé à des douleurs osseuses [115].

Enfin, un rôle de nétrine-1 dans l'endométriose a également fait l'objet de recherches et des résultats, encore non publiés, ont mis en lumière un intérêt de l'anticorps anti-nétrine-1 dans cette indication. En effet, une réduction de la douleur dans un modèle murin a été mise en avant de même qu'un effet sur les lésions de l'endomètre. Cette nouvelle indication est d'autant plus intéressante compte-tenu du lien étroit endométriose-inflammation-cancer dans lequel nétrine-1 semble être un des points communs [116]. En effet, l'endométriose est associée à une forte inflammation au niveau des lésions qui la caractérise et a un risque plus élevé de développement de cancers, notamment des cancers de l'ovaire [117].

1.4.3.2.4 Nétrine-1 & maladies neurodégénératives

Afin d'assurer la viabilité neuronale à long terme, les cellules du cerveau deviennent très majoritairement résistantes à l'apoptose à l'âge adulte. Cependant, au cours de maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer, de Parkinson ou encore la chorée de Huntington, un excès d'apoptose de certains neurones a lieu suite à une accumulation de protéines malformées dans les cellules ou la matrice extracellulaire [118]. L'apoptose joue donc un rôle pivot dans ces maladies. De par ses propriétés inhibitrices de l'apoptose en tant que ligand des RD et son origine d'expression dans des territoires neuronaux, nétrine-1 est donc une protéine qu'il est intéressant d'étudier dans ce contexte.

1.4.3.2.4.1 *La maladie d'Alzheimer*

Lourenço *et al.* ont mis en évidence une interaction de nétrine-1 avec APP entraînant une inhibition de la production de la forme clivée de cette dernière dont l'accumulation participe à la maladie [119]. Cette même équipe a également montré dans un modèle murin que l'administration de nétrine-1 dans le cerveau est associée à une amélioration de la maladie ce qui est cohérent avec le rôle protecteur de nétrine-1 contre l'apoptose. Une approche expérimentale visant à surexprimer la protéine anti-apoptotique *B-cell lymphoma-2* (Bcl-2) a permis de montrer chez des souris malades une amélioration de différents marqueurs de la maladie et une amélioration de la mémoire [118].

Plus récemment, il a été montré que le rôle de nétrine-1 dans ce contexte pathologique pourrait également passer par ses propriétés immunorégulatrices. En effet, Sun *et al.* ont montré dans un autre modèle murin de la maladie que la diminution de nétrine-1 associée à Alzheimer est corrélée avec une perturbation de la balance entre les lymphocytes T helper 17, qui sont pro-inflammatoires, et les lymphocytes T régulateurs, anti-inflammatoires. La perturbation de cette balance entraîne la mise en place d'un environnement inflammatoire, connu pour être un environnement clé au développement de la maladie [120].

1.4.3.2.4.2 *La maladie de Parkinson*

La maladie de Parkinson est caractérisée par une dégénérescence progressive des neurones dopaminergiques dans la région du cerveau contrôlant l'activité motrice. Au sein de cette région du cerveau, DCC et nétrine-1 sont particulièrement exprimés ce qui a conduit le laboratoire du Dr. Patrick Mehlen à investiguer le rôle de nétrine-1 dans le devenir de ces cellules. En effet, il a été montré dans des échantillons de patients que le niveau de nétrine-1 est significativement diminué chez les personnes malades. Jasmin *et al.* ont également exposé que DCC régule au moins partiellement la mort des neurones dopaminergiques tout comme la perte de nétrine-1 qui entraîne également une perte dramatique de ces neurones. Dans ce contexte pathologique, l'injection de nétrine-1 recombinante semble être une stratégie thérapeutique intéressante pour cette affection en permettant de limiter la mort des neurones par apoptose [121].

1.4.3.2.4.3 *La chorée de Huntington*

La chorée de Huntington est une maladie neurodégénérative qui se caractérise également par l'apoptose d'une certaine population neuronale du SNC. Il a été rapporté il y a quelques années que DCC et UNC5-D sont surexprimés dans un modèle *in vitro* de la maladie et que l'ajout de nétrine-1 joue un rôle de neuroprotection [122].

1.5 *Nétrine-1, une cible thérapeutique*

1.5.1 *Stratégie*

Comme il vient d'être présenté, nétrine-1 intervient dans diverses situations pathologiques chez l'Homme. Ce constat a poussé le laboratoire du Dr. Patrick Mehlen à investiguer le potentiel thérapeutique de l'inhibition de l'interaction nétrine-1/RD dans ces contextes et notamment dans celui des cancers. Ainsi, comme preuve de concept, le laboratoire a montré dans plusieurs modèles incluant, entre autres, le cancer du poumon, le neuroblastome ou encore le cancer du sein métastatique, que l'inhibition de l'interaction entre nétrine-1 et ses récepteurs était suffisante pour induire une apoptose des cellules cancéreuses et permettre alors une régression des tumeurs [89], [91], [95], [123].

Lors de ces preuves de concept, les stratégies utilisées pour bloquer l'interaction de nétrine-1 avec ses récepteurs ont été l'utilisation de *small interfering RNA* (siRNA) ou de protéines recombinantes « leurres » correspondantes aux domaines fibronectine 4 et 5 de DCC qui reconnaissent et se fixent à nétrine-1. En se liant à cette dernière, ces molécules « leurres » empêchent l'interaction ligand/récepteur et permettent alors le déclenchement de la voie pro-apoptotique décrite plus tôt dans ce manuscrit et la mort des cellules cancéreuses.

Face à ces résultats prometteurs, la start-up NETRIS Pharma a été créée en 2008 afin de développer une molécule capable d'être testée chez l'Homme. Cela a conduit à la création d'un anticorps monoclonal humanisé thérapeutique bloquant l'interaction de nétrine-1 avec ses récepteurs, le NP137.

1.5.2 Le NP137

1.5.2.1 Développement pré-clinique

La forte conservation entre la forme murine et humaine de nétrine-1 a rendu compliqué le développement d'un anticorps ciblant spécifiquement la molécule humaine, et les protocoles classiques d'immunisation de souris n'ont pas abouti. Des souris hyper-immunes (de type autoimmunes) ont alors été utilisées et ont reçues des injections massives de nétrine-1 humaine recombinante. Cela a permis d'isoler un anticorps murin de haute affinité pour nétrine-1, déplaçant la liaison entre nétrine-1 et UNC5-B et capable d'induire la mort des cellules. Cet anticorps murin, schématisé dans la **Figure 13**, a ensuite été humanisé. C'est ainsi que naquit le NP137, une immunoglobuline de 150kDa, d'isotype (Ig)G1/kappa humanisé de premier rang reconnaissant spécifiquement un épitope de 22 acide-aminés du domaine V2 de nétrine-1 [8]. Cet épitope a également été identifié comme le site de liaison de nétrine-1 à UNC5-B. et l'interaction entre cet anticorps, nétrine-1 et UNC5-B a été cristallographiée [8]. Des études *in vitro*, *in vivo* et *in silico* ont ensuite été réalisées afin d'obtenir l'autorisation de tester cette nouvelle molécule chez l'Homme.

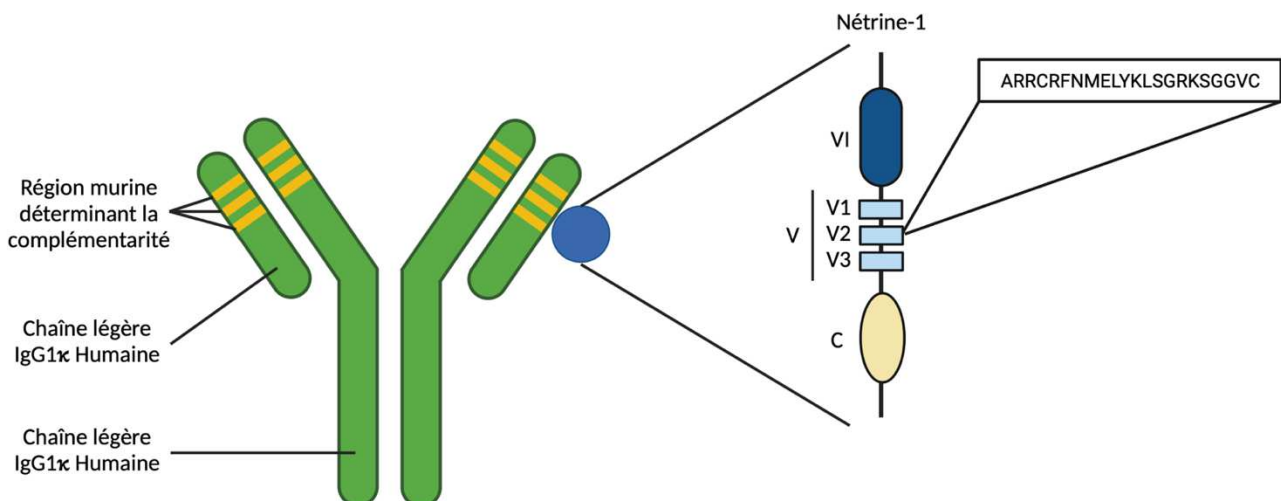


Figure 13 : Représentation schématique du NP137 et site de liaison à nétrine-1

Le NP137, un anticorps murin humanisé, reconnaît la région V2 de nétrine-1, l'empêchant ainsi de se fixer sur son récepteur.

1.5.2.2 Phase clinique

1.5.2.2.1 Première étude chez l'Homme

En novembre 2016, l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament (ANSM) a autorisé un essai-clinique de Phase I pour le NP137 (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02977195>).

Cet essai de phase I, First in Human, vise à évaluer la sécurité, la pharmacocinétique et l'activité clinique du NP137 en monothérapie chez des patients atteints de tumeurs solides avancées. Cette étude non-randomisée, en ouvert et multicentrique, s'est déroulée de février 2017 à juin 2022 au sein du Centre Léon-Bérard de Lyon, l'Institut de Cancérologie de l'Ouest Nantais et l'Institut Claudius Régaud de Toulouse et a permis d'inclure un total de 70 patients.

Elle a consisté en une étape d'escalade de dose suivi d'une première et d'une deuxième phase d'extension comme recommandé dans les essais-cliniques en oncologie au sein desquels l'index thérapeutique est restreint [124]. Le déroulement des différentes étapes de la Phase I est expliqué en détail dans les paragraphes ci-dessous.

1.5.2.2.1.1 La phase d'escalade de dose

L'objectif principal de cette phase est de déterminer la Dose Maximale Tolérée (DMT), *i.e.* la dose la plus élevée d'un médicament qui entraînera l'effet souhaité sans engendrer d'effets secondaires inacceptables, pour ensuite déterminer la Dose Recommandée pour la Phase 2 (RP2D). Pour cela, un schéma en 3+3 a été utilisé et son principe est résumé dans la **Figure 14**.

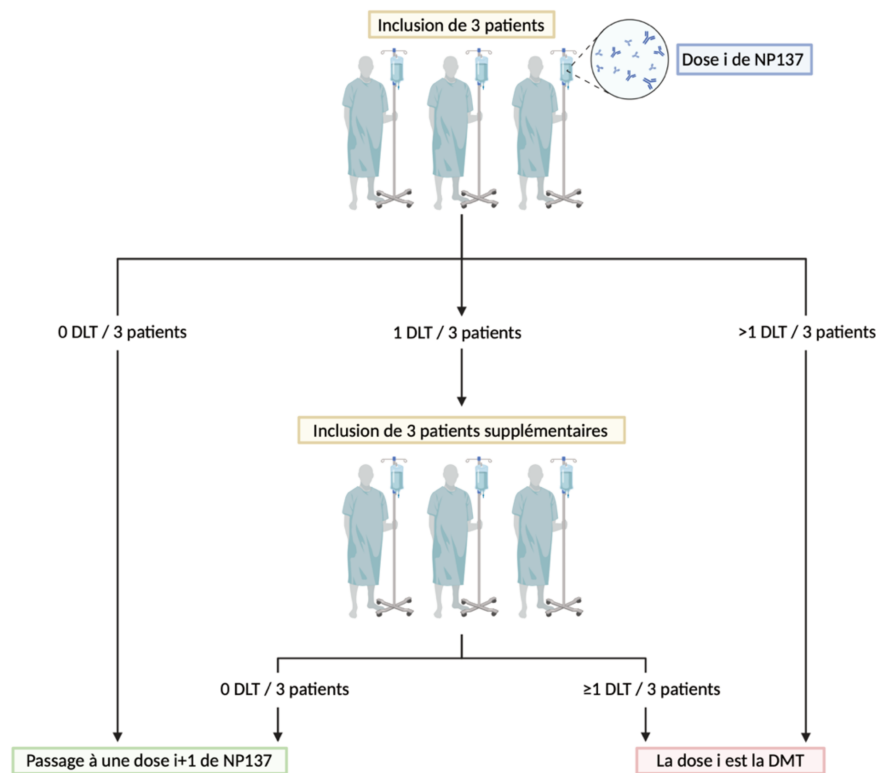


Figure 14 : Méthode d'escalade de dose 3+3

Un petit groupe de trois patients est traité avec une dose initiale déterminée. Si aucun effet indésirable grave n'est observé chez ces patients, la dose est ensuite augmentée pour le groupe suivant de trois patients. Si un effet indésirable grave est observé chez un patient, trois patients supplémentaires sont traités à la même dose pour confirmer la toxicité. Si moins d'un tiers des patients traités à une dose donnée présente des effets indésirables graves, cette dose est considérée comme la DMT. Sinon, le processus d'escalade de dose se poursuit jusqu'à ce que la DMT soit déterminée.

Au cours de cette phase d'escalade de dose, le NP137 a été administré par voie intraveineuse toutes les 2 semaines en testant différentes doses de NP137 (7 paliers de dose allant de 1 mg/kg à 20 mg/kg). Cet essai était ouvert à des patients de plus de 18 ans, atteints de diverses tumeurs solides à un stade avancé ou métastatique, ayant subi plusieurs lignes de traitement et sans autres solutions thérapeutiques.

Cette phase se compose de deux cohortes : une cohorte « escalade de dose » (19 patients) et une cohorte « collection biologique » (23 patients). Dans cette dernière cohorte,

la collecte de biopsies était obligatoire. De plus, seules les doses 6 ; 9 ; 14 et 20mg/kg ont été testées, les doses précédentes ayant déjà été validées uniquement dans la cohorte « escalade de dose ». L'intérêt de cette cohorte biologique était de pouvoir obtenir des résultats sur du tissu humain et ainsi corroborer des résultats pré-cliniques obtenus au laboratoire avec le NP137, notamment en ce qui concerne une épithélialisation des tumeurs et une dégradation de Mcl-1 par l'anticorps (cf. **1.4.1.1.2**).

Lors de la clôture de cette phase d'escalade de dose, 41 % des patients ont présenté une maladie stable dont 17% dès trois mois. Nous avons également pu mettre en évidence deux réponses partielles. D'un point de vue tolérance, les réactions liées aux infusions sont l'événement indésirable le plus fréquent, observé chez plus de 70% des patients, mais fréquents lors des traitements avec des anticorps monoclonaux. Avec cette première phase, la DMT a été identifiée à 20mg/kg. Cependant, le bénéfice clinique n'était pas supérieur à celui obtenu avec la dose de 14mg/kg. Ainsi, la RP2D a été définie à cette dose.

Au vu des réponses cliniques obtenues, il a été décidé pour le processus d'inclusion de la prochaine phase clinique, à savoir la phase d'extension, de se focaliser sur des cancers de la sphère gynécologique (endomètre et col de l'utérus).

1.5.2.2.1.2 La première phase d'extension

Lors de cette première extension, l'objectif principal a été d'étudier l'activité clinique du NP137 lorsqu'il est administré à la RP2D (14mg/kg) en observant le taux de réponse objective à 3 mois dans les indications d'intérêt. Elle a également permis de confirmer la bonne tolérance du NP137.

Cette première phase d'extension a été pensée selon le design Gehan décrit pour la première fois en 1961 et qui est idéal pour effectuer des études préliminaires afin de mettre en évidence l'efficacité d'un candidat médicament [125]. Brièvement, cette méthode se base sur le fait que si un traitement est efficace pour au moins 20% des patients, alors il y a plus 95% de chance de voir une réponse thérapeutique en traitant seulement 14 patients consécutifs. Le prérequis à l'efficacité de cette méthode est la détermination préalable de la posologie et de l'indication thérapeutique optimale, ce qui a été fait lors de la première partie de cet essai.

Dans le cas de cette étude, 14 patientes ont été incluses. 50 % ont présenté une maladie stable à 6 semaines et 29 % étaient encore stables 3 mois après l'inclusion. Les études ancillaires ont également suggéré que les cancers de l'endomètre hormono-dépendants pourraient être plus susceptibles de répondre au NP137. Les données de sécurité collectées jusqu'à présent ainsi que ces premières observations cliniques et biologiques ont motivé l'ouverture d'une seconde phase d'extension chez des patientes hormono-dépendantes présentant un cancer de l'endomètre ayant évolué à un stade avancé ou métastatique.

1.5.2.2.1.3 La deuxième phase d'extension

Durant cette seconde phase d'extension, l'objectif était de se focaliser sur une indication plus précise et de réaliser de façon obligatoire des biopsies avant et après 2 cycles de traitement avec le NP137. Ainsi, 14 patientes ont été recrutées. Après 3 mois de traitement, 23% des patientes présentaient une maladie stable selon les critères RECIST 1.1.

Face à ces résultats prometteurs, et au vu des mécanismes d'action du NP137 mis en évidence en préclinique, d'autres essais cliniques ont vu le jour dans d'autres indications et en combinaison avec les traitements standards actuels. En effet, le NP137 ayant un effet d'épithélialisation des tumeurs, la combinaison NP137 avec les chimiothérapies ainsi que l'immunothérapie devrait améliorer les effets thérapeutiques chez les patients.

1.5.2.2.2 GYNET

Ouvert en décembre 2020, GYNET est une étude de phase Ib/II randomisée, évaluant la sécurité et l'activité clinique et biologique du NP137 en association avec une chimiothérapie Carboplatine-Paclitaxel et / ou le Pembrolizumab, un anticorps anti-PD1, chez des patientes présentant un carcinome du col de l'utérus ou de l'endomètre localement avancé ou à un stade métastatique, progressant ou rechutant après au moins une chimiothérapie systémique antérieure (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04652076>). 15 centres à travers toute la France participent à cette étude et un recrutement de 240 patientes est espéré d'ici la fin de l'essai clinique estimé pour mai 2024. Afin de s'adapter au schéma thérapeutique classique des autres molécules avec lesquelles sont associées le NP137, le schéma d'administration a été modifié à une dose toutes les trois semaines.

L'association du NP137 avec d'autres molécules n'ayant encore jamais été testée chez l'Homme, la Phase Ib de « Safety Run In » a lieu au début de l'essai afin de s'assurer de la tolérance des combinaisons médicamenteuses. Débutant par une approche sentinelle, il est prévu de recruter 6 patientes par bras indépendamment du type histologique. Ainsi, la première patiente de chaque bras est suivie pendant 7 jours durant lesquels aucune autre inclusion ne peut être initiée dans le bras concerné. Si aucun signal de sécurité n'a été notifié, les inclusions peuvent reprendre le 8^{ème} jour, sans aucune restriction. Les patientes sont traitées à la RP2D et il est possible de diminuer la dose à 9mg/kg dans le cas d'apparition de *Dose Limiting Toxicity* (DLT). Le premier critère qui sera surveillé est la survenue de ces DLT à la suite de la combinaison des thérapeutiques. La revue des évènements de toxicité sera réalisée par un comité d'experts indépendants, comité qui devra donner son aval pour la poursuite de l'étude à la fin de cette phase.

La Phase II qui suit se divise en deux parties avec une phase précoce incluant 112 patientes et une phase d'extension incluant jusqu'à 128 patientes supplémentaires. Entre ces deux phases, le comité d'expert indépendant évalue alors l'efficacité du traitement et décide de la poursuite ou fermeture des différentes cohortes de traitement. Le critère d'efficacité premier est la réponse globale qui sera étudiée dès 3 mois de traitement et jusqu'à 2 ans.

Cette étude est toujours en cours et aucun résultat n'est actuellement disponible.

1.5.2.2.3 IMMUNONET

Ouvert en novembre 2022, IMMUNONET est une étude de phase II visant à évaluer l'activité clinique et biologique du NP137 en tant que traitement complémentaire chez des patients atteints de tumeurs solides avancées ou métastatiques traitées par des immunothérapies standards. Au cours de cette étude, le NP137 sera utilisé avec le Pembrolizumab, une immunothérapie bloquant l'interaction *Programmed Death 1* (PD-1)/ *Programmed Death Ligand 1* (PDL-1) (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT05605496>). L'étude prévoit d'enrôler jusqu'à 87 patients présentant des tumeurs solides avancées ou

métastatiques avec une sensibilité variable aux anti-PD-1/PDL-1. Ces patients sont répartis en trois cohortes en fonction de leur sensibilité aux immunothérapies :

- Cohorte 1 : Patients présentant une maladie stable avec un traitement aux anti PD-1/PDL-1,
- Cohorte 2 : Patients présentant une maladie en progression mais également un bénéfice clinique d'un traitement aux anti PD-1/PDL-1,
- Cohorte 3 : Patients présentant une progression de la maladie après une réponse objective à un traitement aux anti PD-1/PDL-1.

Analysé de façon indépendante, le principal critère mesuré dans la cohorte 1 sera le nombre de réponses complètes ou partielles après 3 mois de traitement au NP137. Dans les cohortes 2 et 3, c'est l'absence de progression de la maladie qui sera mesurée, toujours après 3 mois de traitement.

1.5.2.2.4 Liver-NET1

Cette étude est un essai de phase 1b étudiant l'association du NP137 avec la combinaison Atézolizumab-Bévacizumab, deux anticorps monoclonaux respectivement un anti-PD-L1 et un anti-VEGF, dans le carcinome hépatocellulaire non résecable. Cet essai est réalisé en collaboration avec l'hôpital de Grenoble. L'inclusion des premiers patients a été réalisée en mars 2023 (<https://clinicaltrials.gov/study/NCT05546879>). En tant qu'étude de phase I, Liver-NET1 a pour but d'établir l'absence de toxicité lors de l'association du NP137 avec le traitement standard des carcinomes hépatocellulaires, à savoir la combinaison de l'Atézolizumab et du Bévacizumab, mais les signes d'efficacité seront évidemment recherchés. Elle se déroulera de la même façon que la Phase Ib de l'étude GYNET présentée dans le paragraphe **1.5.2.2.2** une phase de « Safety Run In » incluant 3 à 12 patients et une phase d'extension de 40 patients.

1.5.2.2.5 LAP-NET1

Cette étude est une étude de phase Ib visant à évaluer l'activité clinique de l'association du NP137 avec mFOLFIRINOX, une chimiothérapie, dans l'adénocarcinome pancréatique canalaire localement avancé (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT05546853>). Son déroulement sera identique à celui de Liver-NET1.

1.5.2.2.6 Essais à venir

NETRIS Pharma a pour ambition de lancer d'autres essais cliniques sur d'autres indications tel que les leucémies myéloïdes aiguës pour lesquelles l'approbation de l'ANSM est attendue pour juillet 2023, ou encore les sarcomes. L'ouverture vers des domaines thérapeutiques autre que l'oncologie est également à l'étude à la vue de résultats préliminaires intéressants obtenus en laboratoire dans le cas de l'endométriose ou de la diminution de la douleur.

1.5.2.3 Autres applications du NP137 : les thérapies vectorisées

Au-delà de l'effet thérapeutique direct du NP137, la possibilité de l'utiliser comme « cargo » pour d'autres thérapies est également en cours d'investigation. En effet, les études de pharmacocinétique ont montré que le NP137, dans un contexte oncologique, va s'accumuler uniquement au sein de la tumeur, faisant du NP137 un outil de choix pour cibler spécifiquement les tumeurs. En effet, comme nous l'avons vu, l'expression de nétrine-1 dans les tissus adultes sains est très limitée (cf. **1.4.3.1**). Ainsi, deux projets de thérapies vectorisées ont vu le jour et font l'objet de travaux de thèse au sein du laboratoire. Dans ces deux cas, le NP137 permet de délivrer localement, directement aux portes des tumeurs, des thérapies, les rendant ainsi plus efficaces.

Le premier projet consiste en la fabrication de nano-transporteurs recouverts avec l'anticorps contenant des molécules de chimiothérapie qui seront endocytées par les cellules exprimant nétrine-1 et donc les cellules cancéreuses.

Le second consiste au couplage de l'anticorps avec un radioélément, le lutetium-177, et a montré un bénéfice thérapeutique dans plusieurs modèles *in vivo* de xénogreffes [126]. Le couplage du NP137 à l'indium-111, couramment utilisé en imagerie nucléaire, a également révélé le potentiel diagnostique de l'anticorps où il est alors capable de détecter des tumeurs de façon précoce.

Chapitre 2 : Les cellules souches cancéreuses, un challenge thérapeutique

Au sein de ce chapitre, une présentation non-exhaustive des Cellules Souches Cancéreuses (CSCs) sera faite afin de comprendre les propriétés particulières dans ces cellules et leurs rôles majeurs dans la maladie. Mes résultats présentés après cette introduction portants sur les CSCs mammaires et ovariennes, des exemples se rapportants à ces types de CSCs sont utilisés dans ce chapitre. Cependant, les propriétés présentées sont également retrouvées dans les CSCs d'autres types tumoraux.

2.1 Les cellules souches cancéreuses à l'origine de l'hétérogénéité tumorale

L'hétérogénéité tumorale est connue des pathologistes depuis plus d'un siècle et est retrouvée à la fois à une échelle inter-tumorale mais également intra-tumorale [127]. Il est supposé que cette hétérogénéité soit la principale raison des échecs thérapeutiques qui sont malheureusement encore très fréquents. Au cours de l'histoire, deux modèles ont vu le jour pour expliquer l'origine de cette diversité : le modèle stochastique et le modèle hiérarchique. Le modèle stochastique, ou théorie clonale, repose sur le potentiel de chaque cellule d'un tissu, même différenciée, à proliférer de manière incontrôlée et initier la formation tumorale suite à l'accumulation de mutations acquises de façon aléatoire. Dans ce modèle, il n'existe pas de hiérarchie entre les différents clones et toutes les cellules peuvent contribuer de façon équivalente à la croissance tumorale (**Figure 15**). Cependant, ce modèle n'apporte pas directement d'explication à cette hétérogénéité et suggère qu'elle résulte de divers facteurs intrinsèques, comme la coexistence de multiples sous-clones génétiquement différents, et extrinsèques, comme les variations du microenvironnement tumoral. Elle n'explique pas non plus les récurrences de la maladie après traitement.

Le modèle hiérarchique, ou modèle des CSCs, a été proposé pour combler les faiblesses du modèle stochastique. Il repose sur le concept des cellules souches découvertes par Furth et Kahn en 1937 où ils ont montré que la greffe d'une seule cellule était capable d'initier la croissance tumorale [128]. Par la suite, de nombreuses études aboutissent en 1995 à l'identification des premières CSCs dans un cancer liquide : la leucémie myéloïde aigüe [129]. En 2003, la première CSC d'une tumeur solide est identifiée dans les cancers du sein [130]. S'en suit une multitude de travaux montrant l'existence de ces cellules dans différents types de cancers [11] incluant les cancers du cerveau [5]–[7], du poumon [8], de la prostate [9], de la peau [10]. Dans ce nouveau modèle, les tumeurs ne sont pas décrites comme de simples expansions monoclonales mais comme des tissus complexes où les CSCs sont motrices du développement tumoral. Ainsi, les cellules sont hiérarchisées avec d'une part une petite population de CSCs généralement quiescentes ou ayant un rythme de division faible mais alimentant la croissance tumorale et d'autre part le reste des cellules cancéreuses qui prolifèrent à un rythme plus élevé mais incapables former une nouvelle tumeur (**Figure 15**). Cependant, ce modèle présente également des failles provoquant du scepticisme dans la communauté scientifique. En effet, plusieurs expériences du début des années 2010 ont montré l'existence d'une diversité de cellules capables d'initier des tumeurs au sein d'un même cancer [131], [132].

Face à ces résultats, un modèle alternatif a été proposé et postule l'existence d'une plasticité des cellules cancéreuses (**Figure 15**). Dans ce modèle appelé modèle plastique, il est

proposé que des processus intracellulaires et/ou des stimuli du microenvironnement tumoral peuvent influencer une mutation ou une différenciation des cellules souches mais également une dédifférenciation de cellules différenciées conduisant alors à une hétérogénéité tumorale.

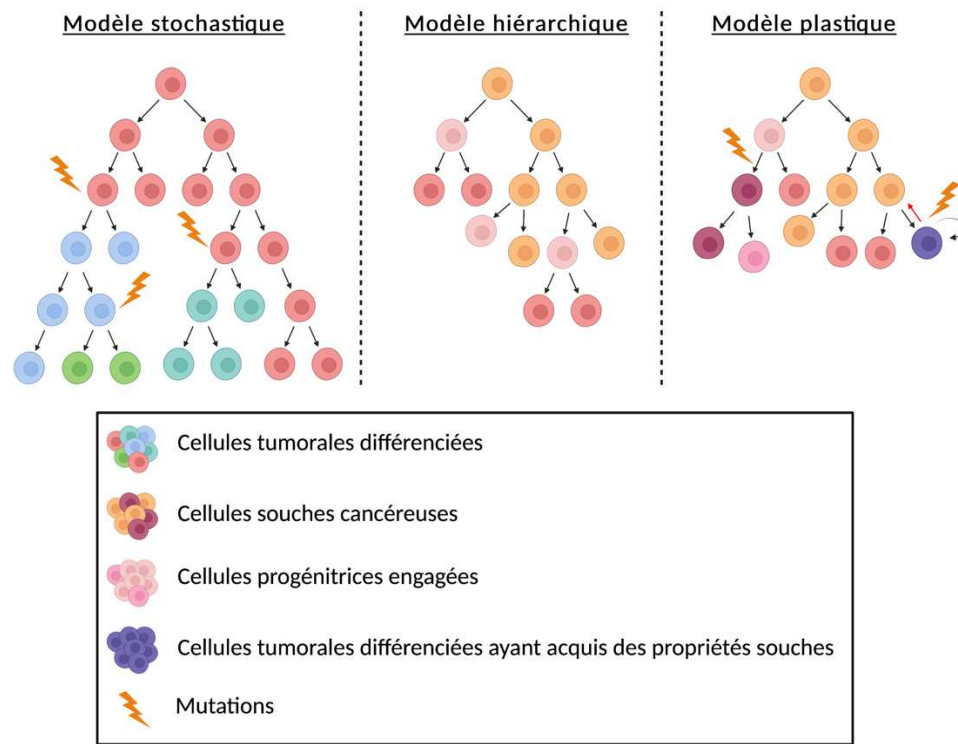


Figure 15 : Modèles hypothétiques de l'hétérogénéité tumorale

Trois modèles ont été proposés pour expliquer l'hétérogénéité tumorale :

- *Modèle stochastique* : Dans ce modèle, les cellules souches cancéreuses sont caractérisées par une plasticité cellulaire aléatoire. Les cellules souches peuvent donner naissance à des cellules différenciées ou à d'autres cellules souches cancéreuses de manière non régulée, conduisant à une hétérogénéité cellulaire dans la tumeur.
- *Modèle hiérarchique* : Dans ce modèle, les cellules souches cancéreuses suivent une hiérarchie bien définie. Les cellules souches situées en haut de la hiérarchie ont la capacité de se différencier en cellules spécialisées, tandis que les cellules souches situées en bas de la hiérarchie conservent leur état de cellules souches cancéreuses. Cette hiérarchie permet une régulation contrôlée de la plasticité cellulaire dans la tumeur.
- *Modèle plastique* : Dans ce modèle, le microenvironnement tumoral influence la plasticité cellulaire des cellules souches cancéreuses. Les signaux provenant du microenvironnement, tels que les cytokines, les facteurs de croissance et les interactions avec les cellules stromales, peuvent induire une transition des cellules souches cancéreuses vers un état plus différencié ou vers un état de réactivation des propriétés de cellules souches.

2.2 Plasticité des CSCs : comment et pourquoi ?

La plasticité cellulaire présentée dans le modèle plastique est notamment médiée par le processus d'EMT, un programme transitoire et réversible permettant la transformation de cellules épithéliales en cellules mésenchymateuses en passant par divers états transitoires associés à des propriétés souches. En effet, plusieurs travaux ont mis en lumière un lien entre la présence de caractères souches et l'EMT.

L'EMT passe par une perte de la polarité cellulaire, la destruction des interactions cellules-cellules entraînant éventuellement une réorganisation du cytosquelette et confère aux cellules cancéreuses des propriétés d'invasion et de migration [133]. Ce processus est sous le contrôle d'un grand nombre de signaux extracellulaires modulant l'expression de facteurs de transcription pléiotropiques.

2.2.1 La niche des CSCs contrôle l'induction de l'EMT et la plasticité des CSCs

2.2.1.1 Vision globale

Les CSCs sont décrites comme étant situées dans un endroit spécifique du microenvironnement tumoral appelé « niche ». Cette niche joue un rôle clé dans l'acquisition et le maintien des caractères souches via des facteurs sécrétés ou des interactions directes entre les cellules tumorales, de l'infiltrat immunitaire, des Fibroblastes Associés aux Cancers (CAF) et des cellules endothéliales, ainsi qu'avec les protéines de la Matrice Extra-Cellulaire (MEC). Des phénomènes liés à la présence de cette niche de la tumeur tel que l'hypoxie sont également impliqués. Ces interactions sont nombreuses et complexes comme illustrées par la Figure 16.

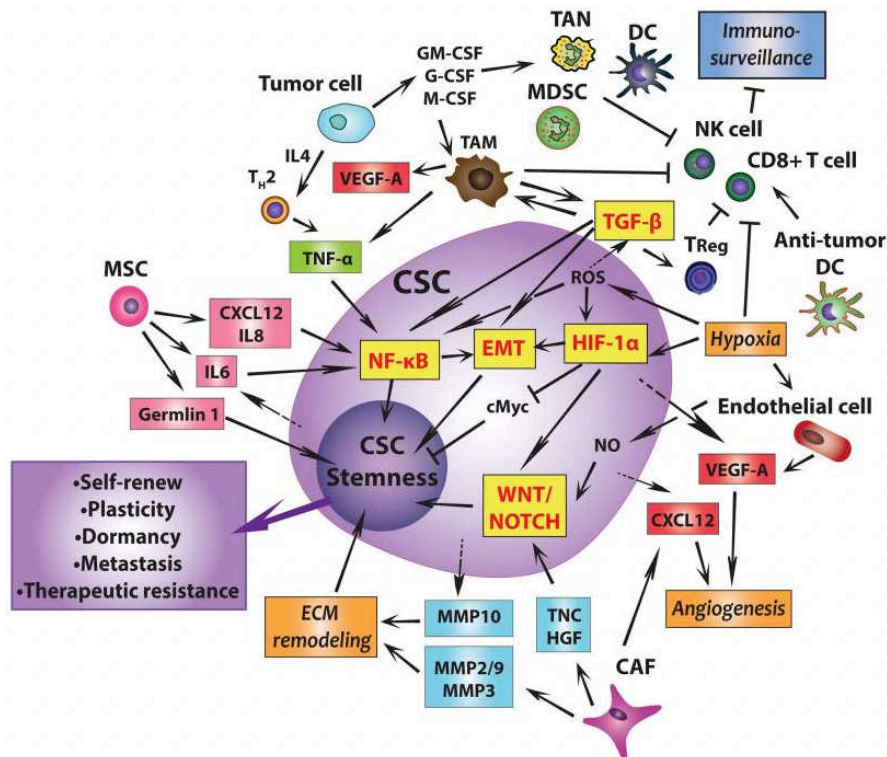


Figure 16 : Schéma des interactions des CSCs avec leurs niches au niveau cellulaire et moléculaire

Figure de Plaks et al. [134]

Les cellules souches mésenchymateuses (CSMs) favorisent les caractères souches des CSCs en activant la voie $NF\kappa B$ et en produisant de la Gremlin-1 connue pour favoriser un état indifférencié. En retour, les CSCs sécrètent de l'interleukin (IL) 6 afin d'attirer plus de CSMs dans la niche.

Les cellules cancéreuses non-souches de la niche produisent de l'IL-4 favorisant le recrutement de Lymphocytes T Helper (T_H) 2 qui produisent du Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) activant la voie $NF\kappa B$. Elles produisent également plusieurs cytokines : le Macrophage colony-stimulating factor (M-CSF), le Granulocyte-Macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) et le Granulocyte-Colony Stimulating Factor (G-CSF). Ces cytokines permettent l'expansion de macrophages associés aux tumeurs (TAMs), de cellules

suppressives dérivées de la lignée myéloïde (MDSCs), de neutrophiles associés aux tumeurs (TANs) et de cellules dendritiques (DCs), composants essentiels de la niche des CSCs.

Les TAMs produisent du TNF- α et du Transforming Growth Factor- β (TGF- β) qui vont tous les deux promouvoir le processus d'EMT et donc la plasticité des CSCs. Le TGF- β peut également activer directement la voie NF κ B qui favorise l'état souche de la CSCs. Le TGF- β produit par les TAMs possède également un rôle de modulation de l'environnement immunitaire en favorisant l'accumulation de lymphocytes T régulateurs (T_{reg}). Ensemble, les TAMs, T_{reg} et l'environnement hypoxique désactive l'immunosurveillance en inhibant les lymphocytes T CD8⁺ (LT-CD8), les cellules Natural Killers (NK) et la phagocytose des macrophages.

L'hypoxie de la niche augmente la production de dérivés réactifs de l'Oxygène (ROS) favorisant alors la survie cellulaire et l'EMT via la voie de signalisation du TGF- β . Ensemble, l'hypoxie et les ROS induisent l'expression de HIF-1 α qui active directement l'EMT. Ce manque d'oxygène promeut également un état indifférencié via les voies de signalisation du TGF- β et la voie Wnt.

Suite au milieu hypoxique, les cellules endothéliales de la niche favorisent l'angiogenèse via la production de VEGF. Les fibroblastes associés aux cancers (CAFs) participent également à la promotion de l'angiogenèse via la production de la chimiokine CXCL12. L'angiogenèse est soutenue par les CSCs qui produisent également VEGF et CXCL12.

Les CAFs produisent de la Tenascin-C et de l'Hepatic Growth Factor (HGF) qui vont tous les deux induire l'activation des voies Wnt et Notch impliquée dans le maintien des caractères souches des CSCs. Les CAFs produisent également des métalloprotéases (MMP) impliquées dans la dégradation de la matrice extracellulaire promouvant alors l'EMT et l'état souche des CSCs.

Il existerait donc un dialogue complexe entre les CSCs et les composants de sa niche afin de mettre en place un microenvironnement propice au maintien des caractères souches.

2.2.1.2 Rôle des fibroblastes associés au cancer

Comme présenté dans la **Figure 16**, le microenvironnement se compose de nombreuses cellules parmi lesquelles on trouve les CAFs. Il est intéressant de souligner qu'un lien entre nétrine-1, les CSCs et les CAFs a récemment été mis en avant dans notre laboratoire.

En effet, Sung *et al.* ont montré que les CAFs contrôlent la plasticité cellulaire grâce à nétrine-1 [135]. Contrairement à ce qu'il était pensé jusque là, les cellules tumorales ne sont pas les cellules à produire nétrine-1. Les CAFs sont également des cellules sécrétrices de nétrine-1 et permet le dialogue entre ces deux types cellulaires. Les auteurs ont montré que nétrine-1 produite par les CAFs participe au maintien des CSCs via la fixation de nétrine-1 sur son récepteur UNC5-B. De même, nétrine-1 joue également un rôle dans le microenvironnement cytokinique, l'inhibition de sa fixation entraînant une diminution d'IL-6 dans le microenvironnement.

2.2.2 Les facteurs de transcription de l'EMT

Trois familles de facteurs de transcription ont été identifiées dans la régulation de l'EMT : les membres du groupe *Zinc-finger E-box binding homeobox* (ZEB) avec ZEB1 et ZEB2, les membres de la famille des protéines Twist (TWIST1, TWIST2 et TCF3) et les membres de la famille Snail (Snail et Slug). De plus, de récentes études ont mis en avant un lien entre ces facteurs de transcription et la présence de caractères souches au sein des cellules tumorales. Par exemple, le facteur de transcription ZEB1 connu pour réguler l'expression du marqueur CD44 est impliqué dans le passage de cellules épithéliales mammaires transformées d'un état non-souche à un état souche, caractérisés respectivement par un faible ou un haut niveau d'expression de CD44 [16]. De même, la surexpression des facteurs Snail ou TWIST entraîne le développement de propriétés d'auto-renouvellement de ces cellules. Ceci est mesurées par

leur capacité à former des sphères ou encore à initier la formation de nouvelles tumeurs, des caractéristiques propres aux CSCs [17]. Enfin, dans les cancers ovariens, l'expression de plusieurs facteurs de transcription impliqués dans l'EMT a été détectée dans les cellules résistantes à la chimiothérapie, cette propriété est associée aux CSCs et sera développée ultérieurement (cf. **3.4.2.1**) [18]. Ces facteurs de transcription coopèrent généralement pour la mise en place de l'EMT. Il a également été constaté qu'ils étaient capables de se réguler entre eux [19].

2.2.3 Un rôle majeur de la plasticité des CSCs dans la dissémination métastatique

En plus de sa complexité, le processus d'EMT est également dynamique et réversible. En effet, au cours du processus d'EMT la cellule ne passe pas directement d'un état complètement épithélial à un état totalement mésenchymateux. Les cellules acquièrent des phénotypes transitoires au sein desquels cohabitent des propriétés spécifiques des deux états, conférant ainsi aux cellules un état non stable, très plastique, caractéristique des CSCs et capable de transformations rapides bénéfique au développement tumoral (**Figure 17**) Il est, par conséquent rare de voir un processus d'EMT « complet » dans les carcinomes humains ce qui est tout au bénéfice des CSCs. En effet, les cellules complètement mésenchymateuses, bien que capables de migrer, sont peu prolifératives donc peu avantageuses pour la tumeur. En effet, l'acquisition d'un phénotype complètement mésenchymateux est associée à une perte de propriétés souches, de plasticité et de capacité à induire le développement de tumeurs [20]. Au contraire, les états épithélio-mésenchymateux (E/M) intermédiaires sont associés à des propriétés souches plus importantes [21], [22]. En adéquation avec le modèle de plasticité des CSCs, des études suggèrent l'existence de deux sous-population de CSCs : les CSCs-E/M ayant un cycle cellulaire long mais de grandes capacités d'invasion et les CSCs epithelial-like (E) capables d'initier la croissance et l'hétérogénéité tumorale [23], [24].

Grace au processus de Transition Mésenchymo-Epithéliale (MET), phénomène inverse de l'EMT, les cellules sont capables de passer d'un état plus mésenchymateux à un état plus épithélial (**Figure 17**). Les mécanismes de cette transition restent encore assez énigmatiques mais l'hypothèse principale au sein de la communauté scientifique est qu'elle survient à la suite d'une désactivation du programme d'EMT passant notamment par une diminution/disparition de l'expression des facteurs de transcription spécifiques de ce programme. Il est également possible que cette MET se fasse de façon active via l'induction de l'expression de gènes épithéliaux par différents facteurs de transcription [25].

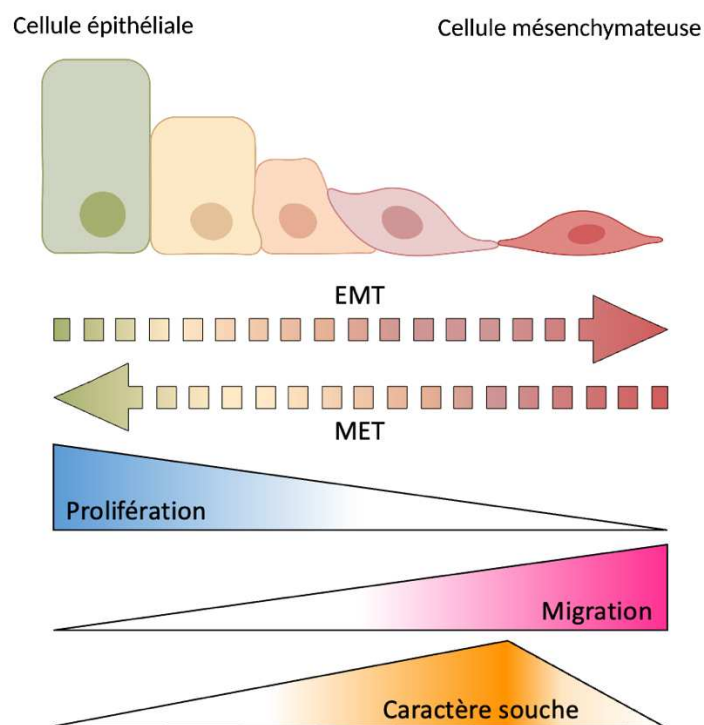


Figure 17 : EMT/MET et propriétés associées

Les cellules épithéliales et mésenchymateuses sont capables de passer d'un état à un autre en passant par différents états intermédiaires via les processus d'EMT et MET. Une modulation des propriétés de prolifération, migration et d'expression des caractères souches est associée à ces états intermédiaires.

Ainsi, le modèle le plus communément accepté pour expliquer le développement des métastases est que des CSCs-E/M hybrides de la tumeur primaire sont capables de quitter le site tumoral par extravasation et ainsi aller coloniser d'autres organes en passant par la circulation sanguine. Sur le site de la métastase, les CSCs-E/M établissent des relations clés avec la MEC afin de mettre en place une niche adéquate pour leur survie. Par la suite elles évoluent en CSCs-E via le processus de MET afin d'initier la croissance et le développement d'une métastase qui récapitule la formation d'une tumeur [136]. Ce schéma repose sur plusieurs travaux qui ont montré que la MET est essentielle pour la colonisation des tissus à distance du site de développement de la tumeur primaire [137]–[139].

Les processus d'EMT/MET qui permettent le maintien des propriétés souches des CSCs et la dissémination des cancers jouent donc un rôle primordial dans le modèle de plasticité des CSCs expliquant l'hétérogénéité tumorale. L'identification des différents états de transition dans lesquels peuvent se trouver les CSCs et les voies de signalisation impliquées font l'objet d'intenses recherches. En effet, impacter la plasticité des CSCs semble être une stratégie prometteuse pour le traitement des cancers. Il est donc nécessaire de comprendre en profondeur les mécanismes pour pouvoir identifier des points de vulnérabilité afin développer de nouvelles thérapies empêchant cette plasticité.

2.3 Voies de signalisation des CSCs

Plusieurs voies de signalisation incluant les voies Wnt, Notch, SHH, NF- κ B et Hippo ont été décrites comme jouant un rôle dans les CSCs [30]. Les interconnexions entre ces voies ou avec les voies de contrôle de l'EMT, sont complexes.

Dans un souci de synthèse, ce manuscrit ne présente que succinctement les voies Wnt et Hippo impliquées dans ce premier projet mais également dans le second projet sur les synovialosarcomes.

2.3.1.1 La voie Wnt

La voie Wnt est l'une des principales voies de signalisation cellulaire impliquée dans de nombreux processus biologiques, y compris le développement embryonnaire, la régénération tissulaire, la formation des tumeurs, l'EMT et le maintien d'un état souche dans les cellules souches [31]. Cette voie est composée de deux voies : la voie canonique également connue sous le nom de voie Wnt/ β -caténine et les voies non-canoniques. C'est la nature du ligand Wnt qui déterminera la voie qui va être activée. Ainsi les ligands Wnt1, Wnt2b, Wnt3a et Wnt8 ont été décrits comme des activateurs de la voie canonique tandis que les protéines Wnt5a et Wnt11 ont été décrits comme des ligands induisant une voie non canonique [32].

2.3.1.1.1 La voie Wnt/ β -caténine

Comme son nom l'indique, la β -caténine est la protéine médiatrice de cette voie. Wnt-1, Wnt-3a et Wnt-8 ont été identifiés comme faisant partie des principaux ligands impliqués dans l'activation de cette voie [32]. Son mécanisme peut être décrit en plusieurs étapes explicitées ci-dessous et schématisé dans la **Figure 18**:

1. **Activation du récepteur** : La voie Wnt canonique est initiée par la liaison d'un ligand Wnt soluble aux récepteurs *Frizzled* (FZD) et son corécepteur *Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 5/6* (LRP5/6) présents à la surface de la cellule cible.
2. **Inhibition de la destruction de β -caténine** : L'interaction du ligand Wnt avec les récepteurs FZD et LRP5/6 entraîne une cascade de signalisation aboutissant à l'inhibition de la destruction de la β -caténine. En effet, en temps normal, la β -caténine est dégradée par un complexe de destruction comprenant les protéines *Adenomatous Polyposis Coli* (APC), Axin et *Glycogen Synthase Kinase* (GSK) 3 β . L'activation de la voie Wnt permet une désactivation de ce complexe de destruction par la protéine *Dishevelled* (DVL) permettant ainsi à la β -caténine de s'accumuler dans le cytoplasme.
3. **Activation de la transcription** : A la suite de cette accumulation, la β -caténine va transloquer dans le noyau de la cellule et se lier à des régions spécifiques de l'ADN, appelées éléments de réponse aux facteurs de transcription *T-Cell Factor/Lymphoid Enhancer-Binding Factor* (TCF/LEF) activant ainsi la transcription de gènes cibles régulés par la voie Wnt.

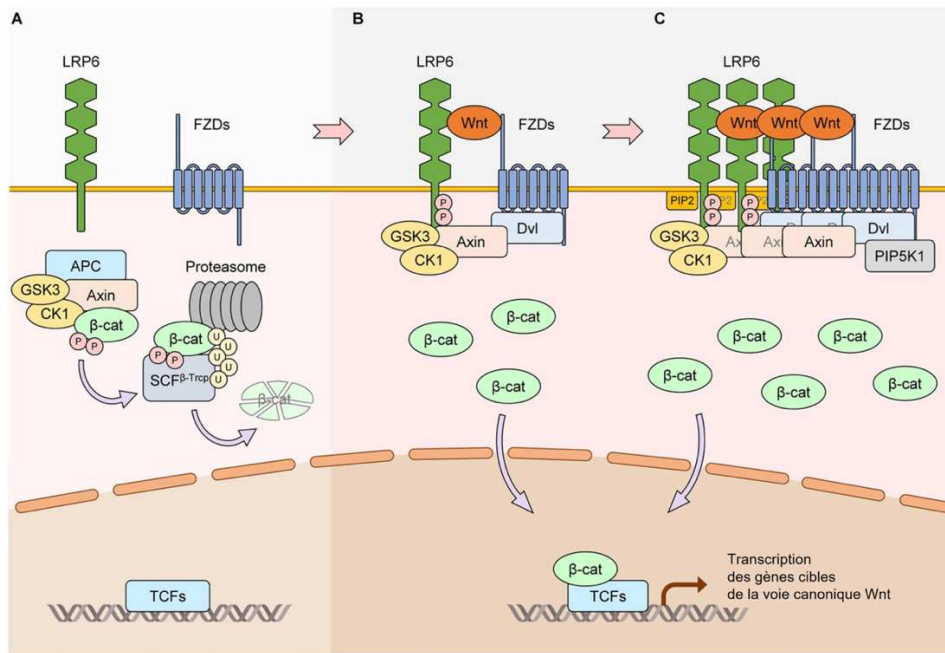


Figure 18 : La voie canonique Wnt- β -caténine

Figure de Jeong et Jho (2021) [140]

En l'absence d'activation de la voie Wnt, β -caténine est phosphorylée par un complexe de destruction formé par les protéines APC, Axin et GSK3 β entraînant sa dégradation. La fixation du ligand Wnt sur son récepteur FZD permet à β -caténine de s'accumuler et de transloquer dans le noyau. Dans le noyau, β -caténine agit en tant que coactivateur transcriptionnel, interagissant avec des facteurs de transcription de la famille TCF/LEF et activant l'expression de gènes cibles impliqués dans la prolifération cellulaire, la survie, la différenciation et d'autres processus cellulaires.

2.3.1.1.2 Les voies non-canoniques

Il existe deux voies Wnt non-canoniques indépendantes de la β -caténine : la voie planaire de polarité cellulaire (Wnt/PCP) et la voie du Wnt calcique (Wnt/Ca²⁺). Parmi les principaux ligands impliqués dans l'activation de cette voie on trouve par exemple Wnt4, Wnt-5a et Wnt-11 [141]. La signalisation de ces deux voies est illustrée dans la **Figure 19**.

La voie Wnt/PCP est l'une des deux principales voies de signalisation non canoniques associées à la voie Wnt et joue un rôle essentiel dans le développement embryonnaire, en particulier dans la régulation de l'orientation et de la polarité cellulaire dans les tissus et les organes. Les étapes principales de sa signalisation sont les suivantes :

1. **Activation du récepteur** : Tout comme la voie canonique elle est initiée par la liaison du ligand Wnt à son récepteur FZD déclenchant une cascade de signalisation à l'intérieur de la cellule.
2. **Activation des protéines Rho et Rac** : Suite à l'activation du récepteur FZD, DVL est recrutée et activée. Elle active les petites protéines G Rho et Rac, qui sont des régulateurs clés du cytosquelette d'actine.
3. **Activation de la voie de la kinase c-Jun N-terminal (JNK)** : Rac va permettre l'activation de la voie de la kinase JNK qui va alors phosphoryler la protéine c-Jun. Cette phosphorylation aboutit à une translocation dans le noyau et l'activation des gènes cibles

La voie Wnt/Ca²⁺, quant à elle, est impliquée dans divers processus cellulaires tels que la régulation de la différenciation ou la migration cellulaire. Les étapes principales de sa signalisation sont les suivantes :

1. **Activation du récepteur et des protéines G :** L'initiation de cette voie se fait également par la fixation du ligand Wnt sur son récepteur FZD. L'activation du récepteur FZD conduit alors *in fine* à une augmentation de Ca²⁺ intracytosolique via l'activation des petites protéines G et de la phospholipase C (PLC). Plusieurs conséquences découlent de cette augmentation.
2. **Activation de la calcineurine :** Une fois que le Ca²⁺ intracellulaire est augmenté, il active la phosphatase calcineurine. La calcineurine déphosphoryle *Nuclear Factor of Activated T cells* (NF-AT), qui se trouve généralement dans le cytoplasme sous une forme inactive. NF-AT déphosphorylé est alors capable de transloquer dans le noyau, où il active la transcription de gènes cibles.
3. **Activation du complexe Ca²⁺/Calmoduline II (CamKII) et régulation de la voie Wnt par *Nemo-like Kinase* (NLK) :** L'augmentation du Ca²⁺ intracellulaire permet également l'activation de la kinase CamKII qui phosphoryle et active NLK. Cette dernière peut alors interagir avec divers facteurs de transcription, dont TCF/LEF de la voie Wnt canonique, dont elle module l'activité transcriptionnelle.

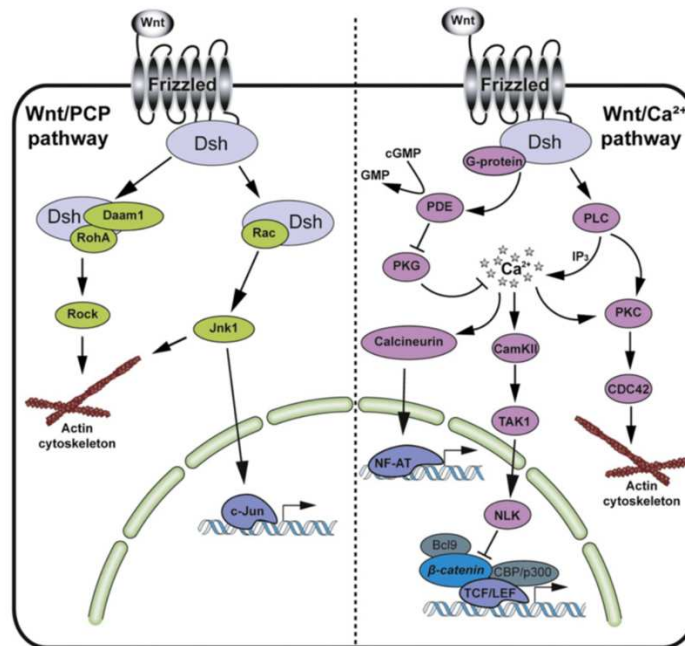


Figure 19 : Schéma des voies de signalisation Wnt non-canoniques

Figure de Sonderegger et Pollheimer (2010) [142]

L'activation des voies Wnt non-canoniques passent par l'activation de la fixation du ligand sur les récepteurs FZD aboutissant à l'activation de la protéine DVL. Dans la voie Wnt/PCP, l'activation de DVL stimule la signalisation à travers des protéines Rho GTPases, telles que RhoA et Rac aboutissant à un remaniement du cytosquelette d'actine ou à l'activation de la voie JNK. Dans la voie Wnt/Ca²⁺, l'entrée de calcium intracellulaire induite par l'activation de DVL permet une activation des gènes cibles de NF-AT via une activation de la calcineurine qui déphosphoryle ce facteur de transcription. Le Ca²⁺ permet également une modulation de la transcription génique via CamKII qui active NLK. Parmi les cibles modulées on trouve notamment TCF/LEF de la voie canonique.

Ainsi, bien que les voies Wnt canonique et non canonique aient des effets distincts, elles sont étroitement liées et peuvent se croiser à plusieurs niveaux. Par exemple, la voie Wnt/Ca²⁺ peut moduler l'expression génique induite par la voie canonique via NLK. Cette intrication complexe des voies Wnt canoniques et non canoniques permet une régulation fine des processus biologiques lors du développement embryonnaire, de la régénération tissulaire et de la progression tumorale. La compréhension de ces interactions est essentielle pour mieux cibler les voies Wnt dans le développement de thérapies contre les maladies, y compris les cancers.

2.3.1.1.3 Les voies Wnt dans les CSCs mammaires et ovariennes

Compte tenu du rôle des voies Wnt, elles sont souvent retrouvées associées à des propriétés spécifiques des CSCs bien que les rôles de la voie canonique soient beaucoup mieux décrits. Par exemple, Jang *et al.* ont montré qu'une inhibition de la voie canonique induisait une perte de capacité à former des sphères dans des lignées de cellules murines de cancer du sein triple négatif [143]. De même, dans les CSCs ovariennes la surexpression de miR-1207, un *micro ARN* (miRNA), est associée à une importante activation de la voie Wnt/ β -caténine. Ainsi, une perte de cette surexpression est associée à une perte des capacités d'auto-renouvellement, à la fois *in vitro* et *in vivo* [144]. Dans le cas des voies Wnt non-canoniques, une équipe égyptienne a par exemple montré dans les cancers du sein triple négatif que syndecan-1, un corécepteur de la voie Wnt/PCP, est associé à l'activité d'ALDH1 caractéristique des CSCs ainsi que l'expression de CD44, marqueur de cette population [145]. Ainsi, l'inhibition de cette voie a montré des résultats prometteurs associés à une diminution de la prolifération des CSCs [146].

2.3.1.2 La voie Hippo

2.3.1.2.1 Description de la voie

La voie Hippo, également appelée *Yes Associated Protein* (YAP)/ *Transcriptional co-activator with PDZ-binding motif* (TAZ), est une voie de signalisation qui a été l'objet de nombreuses recherches ces 10 dernières années et pour laquelle des rôles dans le développement des organes, la tumorigenèse, la régénération tissulaire et l'auto-renouvellement des cellules souches ont été mis en évidence [42]. Cette voie ne possède pas de récepteurs ou de ligands spécifiques décrits. Elle est régulée par des signaux extracellulaires provenant de l'environnement et se fixant à différents récepteurs. On note par exemple une activation de cette voie par les récepteurs couplés aux protéines G, les récepteurs à activité tyrosine kinase ou encore les récepteurs FZD des voies Wnt [43]. La voie de signalisation est décrite ci-dessous et est illustrée dans la **Figure 20**.

1. **Activation de la kinase *L*Arge *T*umor *S*uppressor 1/2 (*LATS1/2*)** : L'activation de la voie Hippo conduit à la phosphorylation de YAP/TAZ par une kinase appelée LATS. L'activation de cette dernière est médiée par une cascade de kinases, notamment mammalian STE20-like protein kinase 1/2 (MST1/2) associée à *Salvador family WW domain-containing protein 1* (SAV1) et *MOB kinase activator 1* (MOB1). Une fois activée, la kinase LATS phosphoryle YAP/TAZ sur des résidus spécifiques.

2. **Inhibition de YAP/TAZ :** Les résidus nouvellement phosphorylés de YAP/TAZ servent alors de site de liaison pour des protéines adaptatrices, telles que 14-3-3, qui bloquent son activité transcriptionnelle en la séquestrant dans le cytoplasme. Cette phosphorylation peut également médier une dégradation de la protéine.
3. **Activation de YAP/TAZ en l'absence de phosphorylation :** Lorsque la voie Hippo est désactivée, YAP/TAZ peuvent échapper à la phosphorylation par LATS et s'accumuler dans le noyau où elles interagissent avec des facteurs de transcription, principalement les protéines *Transcriptional Enhanced Associate Domain* (TEAD), pour activer l'expression de gènes impliqués dans la croissance cellulaire, la prolifération et d'autres processus biologiques comme par exemple le gène du protooncogène bien connu myc.

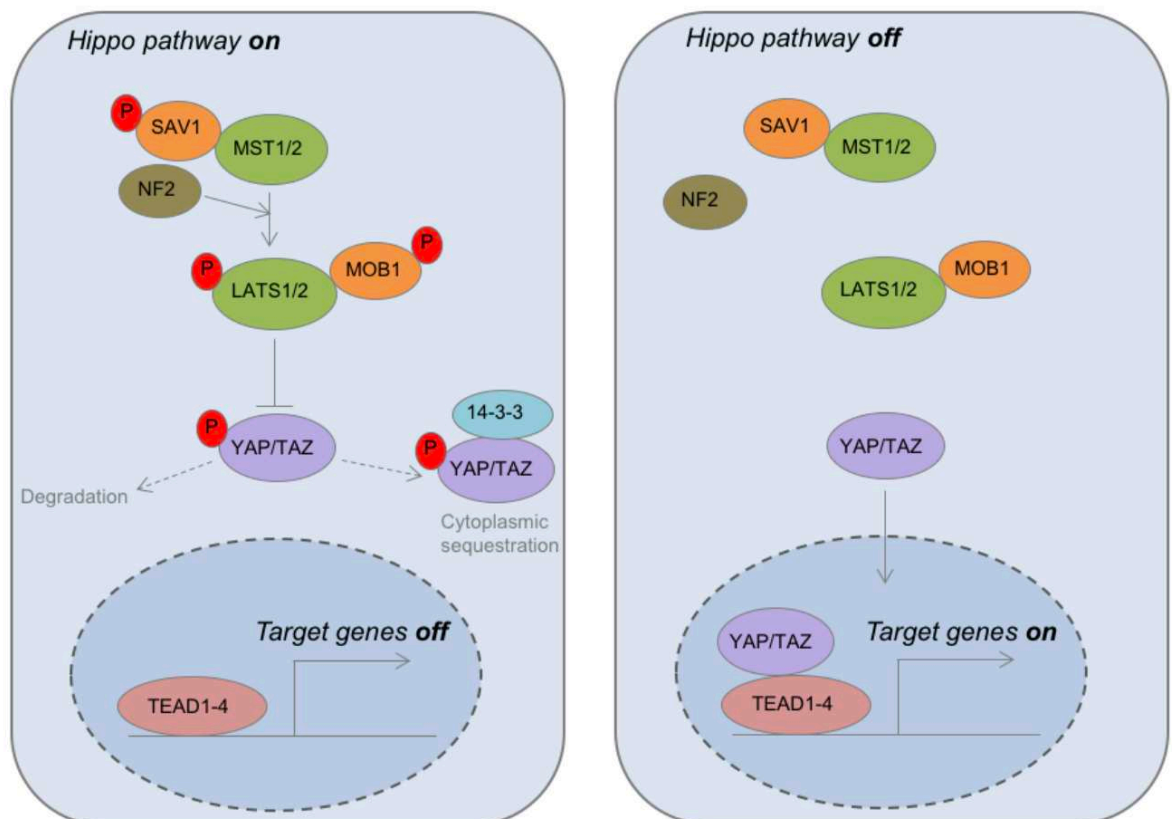


Figure 20 : Schéma de la voie de signalisation de la voie Hippo

La phosphorylation de YAP/TAZ par les kinases MST1/2 et LATS1/2 conduit à leur rétention cytoplasmique et à leur inhibition. Cependant, en l'absence de signaux d'activation de la voie, YAP/TAZ échappent à cette régulation et s'accumulent dans le noyau des cellules.

Une fois dans le noyau, YAP/TAZ interagissent avec des facteurs de transcription, tels que TEAD, et activent la transcription des gènes cibles impliqués dans la prolifération, la survie et la différenciation cellulaire.

2.3.1.2.2 La voie Hippo dans les CSCs mammaires et ovariennes

L'activation de la voie YAP/TAZ a été rapportée à différents niveaux dans différents sous-types de cancers du sein où elle serait probablement associée à un mauvais pronostic [147]–[150]. Un rôle similaire a également été décrit dans les cancers de l'ovaire [151], [152]. Dans la littérature, le rôle de cette voie dans la maintenance des CSCs est majoritairement décrit dans les cancers du sein cependant il est probable qu'il en soit de même dans les cancers de l'ovaire.

Il a été démontré dans ces deux types de cancers, que la protéine YAP se fixe sur un grand nombre de promoteurs de gènes faisant partie de la signature des CSCs confirmant l'implication de cette voie dans le processus d'induction de CSCs [50]. Une autre étude montre que la signature génique dans les CSCs du cancer du sein est similaire à l'expression génique induite par la fixation de YAP/TAZ sur l'ADN suggérant que ces protéines sont bien impliquées dans l'expression des gènes caractéristiques des CSCs [51]. Ces observations suggèrent que la mécanistique des différentes voies de signalisation impliquées dans la maintenance des CSCs est complexe et que ces dernières sont interconnectées. Mieux comprendre leurs mécanismes de régulations est primordiale à l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques et au développement de stratégies de traitement ciblées.

2.4 Propriétés des CSCs

Les CSCs sont caractérisées par deux propriétés majeures : une capacité d'auto-renouvellement/différenciation et une capacité de résistances aux traitements. Cumulées, ces deux propriétés démontrent que les CSCs sont à l'origine des rechutes dans les cancers et qu'elles représentent un véritable challenge thérapeutique. Dans la suite de ce paragraphe, nous allons voir plus en détails ces capacités spécifiques de CSCs.

2.4.1 Auto-renouvellement et différenciation

Les capacités d'auto-renouvellement et de différenciation sont communes à toutes les cellules souches, qu'elles soient saines ou cancéreuses. L'auto-renouvellement désigne le fait qu'au moins une des cellules filles issue de la division d'une cellule souche est identique à la cellule mère. La différenciation quant à elle, désigne la possibilité qu'une des cellules filles soit une cellule progénitrice engagée dans une spécialisation en un certain type cellulaire. Ainsi, la division des cellules souches régit ces deux propriétés fondamentales et deux modes de divisions sont possibles : la division symétrique et la division asymétrique (**Figure 21**) [153].

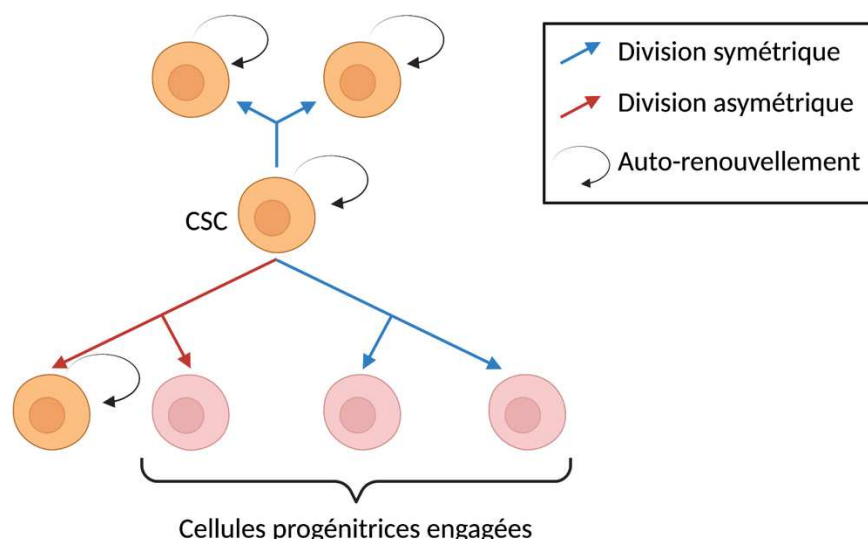


Figure 21 : Représentation schématique des deux types de divisions des cellules souches

La division symétrique (en bleu) se caractérise par l'obtention de deux cellules filles identiques pouvant être des CSCs ou des cellules progénitrices engagées. La division asymétrique (en rouge) se caractérise par l'obtention de deux cellules filles différentes, l'une étant une CSCs et l'autre une cellule progénitrice engagée.

Dans le cas d'une division symétrique, la cellule souche donne deux cellules filles identiques. Ces dernières peuvent également être des cellules souches, permettant alors d'accroître le nombre de ces cellules au cours du développement ou de maintenir un réservoir dans les tissus adultes, mais aussi deux cellules progénitrices déjà engagées dans un processus de différenciation. Dans le cas d'une division asymétrique, les cellules filles sont différentes : l'une est une cellule souche identique à la cellule mère, l'autre est une cellule engagée dans la différenciation. L'équilibre entre ces deux types de division est contrôlé par différents signaux développementaux et environnementaux tels que les voies de signalisation Wnt, Notch ou encore Hippo.

2.4.2 Résistance aux traitements

Un des problèmes majeurs dans la lutte contre le cancer est le développement de résistance aux traitements conventionnels que sont les chimiothérapies et radiothérapies engendrant des rechutes. Plus récemment, l'apparition des immunothérapies a également mis en évidence des mécanismes d'échappement immunitaire développés par les CSCs. Dans la plupart des cas, les résistances aux traitements ont été attribuées à la présence d'une population cellulaire agressive s'avérant être les CSCs [1]–[3]. Ces dernières ont mis en place différents mécanismes de défenses contre les traitements standards, expliquant ainsi la grande difficulté rencontrée pour les éradiquer.

2.4.2.1 Résistance aux chimio- et radio- thérapies

2.4.2.1.1 Éviter l'exposition cellulaire aux thérapies

La première ligne de défense des CSCs contre les chimio- et radio- thérapies est une défense physique. Comme vu dans le paragraphe 2.2.1, les CSCs se trouvent dans une niche. La MEC de cette niche est riche en protéines de collagène fibrillaire, fibronectine, élastine et laminine qui sont capables d'interagir entre elles pour former une barrière rigide et épaisse autour de la tumeur. La MEC est considérée comme un véritable bouclier capable de limiter la diffusion des molécules de chimiothérapie dans la tumeur et donc de diminuer la dose de traitement reçue par les CSCs [56]. De même, elle empêche la pénétration des rayons de radiothérapie au sein des tumeurs [57].

2.4.2.1.2 Éviter l'exposition moléculaire aux thérapies

Dans le cas où la première ligne physique de défense a été franchie, les CSCs possèdent des mécanismes dont le but est d'éviter l'exposition de l'ADN aux molécules de chimiothérapies. Cette deuxième stratégie repose sur la surexpression d'une large superfamille de 49 protéines : les transporteurs *ATP-Binding Cassette* (ABC). Ces transporteurs membranaires utilisent l'énergie issue de l'hydrolyse de l'Adénosine TriPhosphate (ATP) pour transporter les molécules cytotoxiques de chimiothérapie à l'extérieur de la cellule [58]. Leur surexpression entraîne donc une forte augmentation de l'efflux des composés toxiques en dehors de la cellule, expliquant ainsi la chimiorésistance qui se met en place.

Chaque récepteur possède une spécificité de cible, certains ciblant un nombre élevé de molécules tandis que d'autres n'en cible qu'une seule. La nature des transporteurs surexprimés varie également d'un type de cancer à un autre. Ainsi le récepteur ABCB1,

également connu sous le nom de *Multidrug Resistance Protein 1* (MDR1), est retrouvé entre autres dans les cancers du sein et de l'ovaire où il médie la résistance à un large panel de molécules de chimiothérapies (minimum 11 molécules décrites) [59]. Le récepteur ABCA1 quant à lui est exprimé par les CSCs ovariennes mais pas par les CSCs du sein et il médie uniquement le transport du cisplatine [60]. Au contraire ABCC11 va être exprimé par les CSCs mammaires mais pas les CSCs ovariennes et médie l'efflux du *5-Fluorouracile* (5-FU) [61], [62].

Un haut niveau de redondance fonctionnelle entraînant une compensation de l'absence d'un transporteur ABC par un autre a été observé au sein de la superfamille de ces protéines [63]. Cette compensation est en partie responsable de résultats décevants obtenus dans un essai clinique de phase II testant un inhibiteur de ABCB1 chez des patientes atteintes de carcinomes mammaires avancés et résistants aux chimiothérapies [64]. A l'heure actuelle, les efforts de recherche se concentrent sur la compréhension des voies de signalisations impliquées dans la surexpression des transporteurs ABC afin de pouvoir par la suite les cibler via des traitements [65].

2.4.2.1.3 Éviter les conditions nécessaires pour le fonctionnement des traitements

Dans les cas où la molécule cytotoxique envahit le cytoplasme de la cellule, les CSCs possèdent des mécanismes afin d'éviter que les conditions nécessaires au fonctionnement des traitements soient réunies.

2.4.2.1.3.1 *Inactivation intracellulaire*

Une des stratégies que va mettre en place la CSC est une modulation de l'expression de certains composés intracellulaires afin de limiter voire d'inhiber le bon fonctionnement de la molécule. Par exemple, la cellule va augmenter sa production de glutathion (GSH). Le GSH est un tripeptide de glutamate-cystéine-glycine retrouvé dans tous les tissus et jouant un rôle dans la détoxification du cytoplasme. Il est particulièrement surexprimé dans un grand nombre de cancers y compris les cancers du sein et de l'ovaire [66]. Parmi les nombreux rôles du GSH déjà décrits, l'inactivation des sels de platine utilisés dans le traitement des carcinomes mammaires et ovariens joue un rôle important dans le développement des résistances à certains traitements anti-cancer [67]. L'Erastine a récemment été décrite comme une thérapie intéressante pour augmenter la sensibilité au cisplatine en entraînant une déplétion du GSH intracellulaire via une inhibition du transport intracellulaire de cystéine [68].

Un autre moyen de défense est la surexpression de l'ALDÉHYDE DÉS-HYDROGÉNASE (ALDH), un des marqueurs des CSCs, dans un grand nombre de cancers et associée à un mauvais pronostic y compris dans les cancers du sein et de l'ovaire [69]–[71]. L'ALDH est impliquée dans l'inactivation des cyclophosphamides via une oxydation de l'un de ses métabolites, empêchant alors sa transformation en forme biologiquement active [72]. Ainsi, l'ALDH est associée à la résistance à plusieurs chimiothérapies comme le Paclitaxel, l'Epirubicine ou encore la Doxorubicine [73], [74]. De multiples thérapies à base d'inhibiteurs de cette protéine sont en cours de développement. Cependant, il est nécessaire de trouver le juste milieu car l'inhibition d'une seule isoforme d'ALDH n'est pas suffisante alors que l'inhibition d'un nombre trop important d'isoformes peut entraîner une toxicité chez les patients [75].

2.4.2.1.3.2 Quiescence et dormance

Les chimiothérapies et radiothérapies ciblent les cellules ayant un taux élevé de prolifération notamment en induisant des dommages à l'ADN et en inhibant la division mitotique [54], [59]. Cependant, les CSCs ont été décrites comme des cellules majoritairement quiescentes et se divisant donc rarement [76], [77]. De ce fait, les traitements par chimiothérapies et radiothérapies ne les affectent que faiblement. Elles restent souvent présentes suite aux traitements et sont alors capables de donner naissance à de nouvelles tumeurs suite à une rémission, causant des rechutes de la maladie.

Au cours de ces dernières années, de nombreux progrès ont été fait dans la compréhension des mécanismes qui régissent ces états de quiescence et dormance des cellules. Ces découvertes mettent en évidence de nouvelles cibles potentielles pour pouvoir sensibiliser les CSCs aux traitements en les faisant sortir de ces états de latence [78]–[80].

2.4.2.1.4 Réparer les dommages causés

Le maintien de l'intégrité génomique est essentiel pour la survie des cellules et ces dernières ont développé plusieurs mécanismes de réponse aux dommages de l'ADN. Ces mécanismes sont complexes et font intervenir un grand nombre de partenaires. Ils permettent de protéger l'ADN contre toutes sortes de dommages que cela soit une erreur dans l'appariement des bases, une excision de base, une cassure simple ou double brin etc... Ces mécanismes sont évidemment retrouvés et même surexprimés dans les CSCs, leur permettant ainsi de se protéger des effets des traitements.

Dans les CSCs des tumeurs mammaires, une surexpression de *PCNA-associated factor* (PAF) impliqué dans la réparation post-réplication, [81] de RAD51 et/ou de *Ataxia-Telangiectasia Mutated* (ATM) jouant un rôle dans la recombinaison homologue pour la réparation des cassures doubles brins de l'ADN a été observée [82], [83]. Dans certains types de cancer du sein, on trouve également une surexpression de la protéine *BRCA1* associée au mécanisme de réparation des réticulations inter brins [84].

Dans les CSCs des tumeurs ovariennes, la littérature fait, entre autres, état d'une surexpression de *DNA Damage-Binding protein 2* (DDB2) et/ ou de RAD6 impliquées respectivement dans la réparation d'une excision de nucléotide et dans la réparation post réplication [85], [86].

L'inhibition des mécanismes de réparation de l'ADN en ciblant les partenaires protéiques est donc une stratégie thérapeutique en cours d'investigation et montrant des résultats prometteurs dans les cancers du sein et des ovaires [87]–[90].

2.4.2.1.5 Mobiliser des pouvoirs anti-apoptotiques

En cas de dommages à l'ADN non-réparés, l'apoptose va être déclenchée dans la cellule endommagée. Dans les cellules cancéreuses de façon générale, mais encore plus dans les CSCs, deux stratégies existent pour éviter la mort cellulaire : 1-une surexpression des voies anti-apoptotiques, 2-une diminution des voies pro-apoptotiques [154].

Ainsi, plusieurs thérapies sont à l'étude. Par exemple la metformine, un médicament anti-diabétique, a montré un potentiel thérapeutique en diminuant l'expression des protéines pro-apoptotique Bcl-2 et Bcl-xL et en augmentant celle des protéines anti-apoptotiques Bax et Bad [155]. Son effet chez la femme a été évalué dans un essai clinique de phase II et a montré des résultats prometteurs pour le traitement des carcinomes ovariens [156].

Également, la petite molécule LCL161 a également montré un potentiel thérapeutique dans le traitement des cancers du sein triple négatif en inactivant les protéines inhibitrices de l'apoptose [157]. Concernant les voies anti-apoptotiques, la salinomycine est un traitement prometteur notamment grâce à ses propriétés de surexpression du récepteur de mort *Death Receptor 5* (DR5) [158]. La littérature fait état de quelques « *case reports* » dans lesquels cette molécule a montré un potentiel thérapeutique à la fois dans des cancers mammaires et ovariens [159]. Cependant, aucun essai clinique n'a encore été réalisé.

2.4.2.2 Résistance aux immunothérapies

Afin d'assurer leur survie, les cellules cancéreuses ont mis en place plusieurs stratégies pour échapper à la surveillance du système immunitaire. Les CSCs ne font pas exception et plusieurs travaux mettent en évidence que la réponse immunitaire est compromise face aux CSCs [160]. Les mécanismes par lesquels les cellules modulent cet échappement sont nombreux et complexes et ne feront pas l'objet d'une description détaillée dans ce manuscrit. Le rôle de la niche et des CSCs dans la génération d'un environnement immunosuppresseur a déjà été abordé dans le paragraphe 2.2.1. À titre d'exemple, on note que des mécanismes de diminution de la présentation d'antigènes cellulaires ont été décrits sur les CSCs mammaires [161] ainsi qu'une diminution des molécules nécessaires à leur reconnaissance par les lymphocytes T $\gamma\delta$ [162]. Dans les CSCs ovariennes, plusieurs équipes ont décrit une inhibition de la phagocytose par CD24 exprimé à la surface des cellules (cf. 2.5.4). De même les CSCs ovariennes favorisent la polarisation des macrophages de la tumeur en macrophages M0 protumoraux M2 [163].

2.5 Méthodes d'isolation et d'étude des CSCs

Comme précédemment évoqué, les CSCs sont décrites comme possédant des propriétés particulières comme leurs capacités à donner naissance à une nouvelle tumeur mais également leurs propriétés de chimiorésistance. Elles ont également été décrites comme possédant des marqueurs extracellulaires spécifiques. Ces différentes caractéristiques ont été exploitées par la communauté scientifique afin de permettre un isolement ou un enrichissement des CSCs.

Dans la suite de ce paragraphe, nous verrons les différentes méthodes d'isolement des CSCs et principalement celles que nous avons utilisées pour réaliser nos expériences présentées dans la partie « Résultat » de ce manuscrit.

2.5.1 Formation de sphères

Grâce à leurs propriétés d'auto-renouvellement et de différenciation, les CSCs sont capables de former des sphères lorsqu'elles sont mises en culture sans sérum dans des conditions de non-adhérence (**Figure 22**). Le test de formation de sphère est devenu le « gold-standard » pour l'isolement des CSCs ainsi que pour tester les capacités souches des cellules *in vitro*. Depuis le développement de cette méthode en 1992, un grand nombre d'études ont confirmé que la population de CSCs et de cellules initiatrices de tumeur peut être enrichie lorsqu'elles sont cultivées dans un milieu sans sérum supplémenté avec certaines molécules mitogènes comme EGF ou encore le *basic Fibroblast Growth Factor* (bFGF). Dans ces conditions de culture, les cellules immatures et indifférenciées poussent lentement en

formant des tumorsphères tandis que les cellules non cancéreuses ou différenciées meurent [164]. L'efficacité de cette méthode est soutenue par des expériences montrant que les sphères sont enrichies en cellules portant des marqueurs associés aux CSCs [165]–[167].

On souligne cependant quelques limitations à cette méthode, comme le fait qu'elle ne permet pas la détection des cellules quiescentes ou que la densité cellulaire influence fortement la formation de sphères [168].

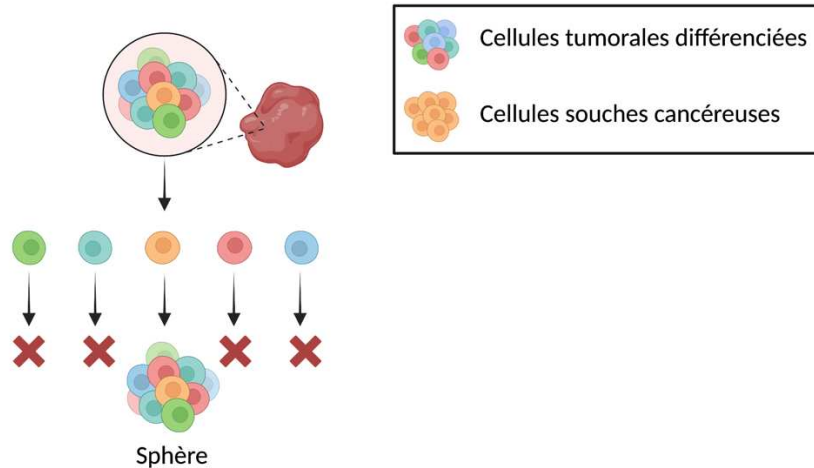


Figure 22 : Représentation schématique de la technique de formation des sphères

2.5.2 Transplantation sériée

Cette technique est l'équivalent *in vivo* de la technique de formation des sphères et permet également d'évaluer les capacités d'auto-renouvellement et de différenciation des CSCs. Elle consiste en la greffe en série de tumeurs dissociées et l'analyse de la prise de greffe.

La nécessité de réaliser les xénogreffes dans des souris immunodéprimées lorsque l'on utilise des tumeurs humaines est la limite majeure de cette technique puisqu'elle néglige totalement l'impact du système immunitaire dans le développement tumoral. La dissociation, à la fois mécanique et enzymatique peut également entraîner des changements métaboliques des cellules modifiant ainsi leur rôle dans la hiérarchie tissulaire. Les cellules dissociées ne se comportent plus de la même manière que quand elles sont localisées dans leur niche. C'est avec ces observations que la communauté scientifique postule que la transplantation sériée permet la sélection de cellules phénotypiquement plastiques, capables de proliférer dans un nouvel environnement plus que de capacité souches. De plus, similairement à la formation de sphères *in vitro*, les xénogreffes ne permettent pas d'obtenir un microenvironnement complexe comme celui retrouvé dans les tumeurs primaires. Néanmoins, la transplantation sériée a le mérite de respecter un environnement tissulaire plus proche de la réalité tumorale.

C'est sur cette capacité à former des tumeurs qu'a émergé le concept de *Tumor Initiating Cells (TICs)* qui est parfois décrit dans la littérature. Ce terme provient d'un débat au sein de la communauté scientifique au sein de laquelle certains chercheurs doutent de l'existence des CSCs. Le terme fait, pour eux, référence à une population cellulaire particulière, les CSCs, et ne désigne pas des cellules tumorales ayant acquis des propriétés d'initiation du développement de tumeurs qu'ils ont donc appelés TICs. Ici, nous considérons que CSCs/TICs sont des cellules identiques.

2.5.3 Sélection par chimio- et radio- thérapies

Comme précédemment décrit dans ce manuscrit, les CSCs sont associées à une résistance aux différents traitements que sont la chimio-, radio- et immuno- thérapie. Si la résistance aux immunothérapies ne peut pas être exploitée *in vitro* car nécessitant un système immunitaire, les résistances aux autres traitements peuvent tout à fait l'être. Ainsi, l'exposition de lignées cellulaires à ces thérapies permet de sélectionner les cellules les plus résistantes aux thérapies conventionnelles et par conséquent enrichir la culture cellulaire en CSCs. Cependant, certaines cellules cancéreuses non-souches peuvent également présenter une résistance aux thérapies ce qui présente une limite de cette méthode.

2.5.4 Sélection par des marqueurs extracellulaires

L'isolement des CSCs par des protéines de surface cellulaire est la méthode la plus communément utilisée. Cependant cette technique nécessite d'avoir identifié des marqueurs spécifiques des CSCs [169]. Ces marqueurs sont identifiés fonctionnellement en mesurant leur association à des caractéristiques spécifiques des CSCs comme la capacité de former des sphères, de résister aux traitements etc... Ces marqueurs sont variables en fonction du type et même du sous-type de cancers[170]. Le

Tableau 1 et le

Tableau 2 récapitulent les principaux marqueurs de surface utilisés chez l'Homme seuls ou en association pour l'identification des CSCs mammaires et ovariennes et en quoi ils sont associés à des caractéristiques spécifiques des CSCs.

Marqueur	Initiation des tumeurs	Résistance aux traitements	EMT, Invasion, métastases	Biomarqueur pronostic*
CD44 ⁺ /CD24 ⁻	[130]	[171]	[172]	Controversé Oui : [173], [174] Non : [175], [176]
CD49f ⁺	[177]	[178]	[179]–[181]	[181], [182]
CD133 ⁺	[183], [184]	[185], [186]	[184], [187]	[188], [189]

Tableau 1 : Principaux marqueurs de surface des CSCs mammaires

Marqueur	Initiation des tumeurs	Résistance aux traitements	EMT, Invasion, métastases	Biomarqueur pronostic*
CD44 ⁺ /CD24 ⁻ CD44 ⁺ /CD117 ⁺	[190]–[193]	[191], [192], [194]	[194], [195]	[195]
CD24 ⁺	[193], [199]	[200], [201]	[199]	[202]
CD117 ⁺	[193], [203]	[203]–[205]	Non décrit	[206]
CD133 ⁺	[193], [207]	[208]	Non décrit	[209]

Tableau 2 : Principaux marqueurs de surface des CSCs ovariennes

*association avec un mauvais pronostic

Plusieurs méthodes peuvent être utilisées pour trier des cellules exprimant des marqueurs de surface spécifiques. Parmi elles on trouve la méthode de *Fluorescence-Activated Cell Sorting* (FACS) ou de *Magnetic Cell Sorting* (MACS). Dans les deux cas, des anticorps ciblant des marqueurs de surface spécifiques des CSCs sont utilisés. Pour un isolement en utilisant le FACS, les anticorps sont couplés à un fluorochrome qui sera détecté par le cytomètre en flux. La machine est ensuite capable d'assigner chaque cellule à un tube permettant ainsi de les trier. Pour la sélection par MACS, et dans le cas d'une sélection positive, les anticorps sont couplés à des nanoparticules magnétiques. Les cellules marquées sont ensuite isolées en passant dans une colonne fixée sur un aimant où elles seront retenues. Lorsque la colonne est détachée de l'aimant, les cellules peuvent être éluées.

Les avantages de cet isolement sont qu'il est beaucoup plus spécifique que les tests fonctionnels. Cependant, les marqueurs utilisés sont parfois utilisés pour l'identification de cellules souches normales ou pour d'autres cellules que celles ayant des propriétés souches pouvant mener à s'interroger sur leur spécificité. De plus, leur expression est énormément affectée par le microenvironnement mais également les conditions de culture cellulaire [100]. Enfin, la procédure de dissociation, marquage et analyse peut endommager les cellules diminuant le nombre de cellules récoltées et limitant les tests fonctionnels pouvant être réalisés par la suite.

2.5.5 Méthode « Side population »

Parmi les propriétés spécifiques des CSCs, on trouve notamment la forte expression de transporteurs ABC impliqués dans la chimiorésistance (cf. 2.4.2.1). La méthode de « side population » tire parti de cette caractéristique en permettant d'identifier les cellules qui justement expriment justement une grande quantité de ces transporteurs. Pour cela, les cellules sont mises en contact avec des molécules fluorescentes se fixant à l'ADN tel que l'Hoechst 33342 ou la Rhodamine 123 puis analysées et triées par FACS. Seules les CSCs ne seront pas marquées, les transporteurs ABC ayant fait sortir le colorant du cytoplasme de la cellule avant que celui-ci ne se fixe à l'ADN. Tout comme la plupart des méthodes, cette technique permet seulement un enrichissement cellulaire en CSCs, étant donné que certaines cellules non-souches sont également négatives [210].

2.5.6 Activité enzymatique de l'ALDH

L'ALDH est exprimée dans les CSCs mammaires et ovariennes [166], [211] et joue un rôle dans la détoxification du cytoplasme y compris dans la résistance aux chimiothérapies (cf. 2.4.2.1.2). Son activité enzymatique peut-être identifiée avec le test de l'ALDEFLUOR [166]. Au cours de cette technique, les transporteurs ABC sont préalablement bloqués avec des inhibiteurs comme le verapamil. Par la suite, les cellules sont mises en contact avec le Bodipy aminoacétaldehyde (BAAA) capable de traverser librement la membrane plasmique. L'ALDH intracellulaire transforme le BAAA en Bodupy aminoacetate (BAA-) qui se retrouve bloqué dans les cellules vivantes. Les cellules contenant BAA- deviennent alors fluorescentes et cette fluorescence peut être détectée en utilisant les méthodes habituelles.

Chapitre 3 : Les synovialosarcomes, focus sur un sarcome épigénétiquement altéré

Les SynovialoSarcomes (SS) appartiennent à la famille des Sarcomes des Tissus Mous (STM). Ils sont plus fréquemment développés chez les adolescents et jeunes adultes [141]. Dans les années 1960, leur survie globale oscillait entre 25 et 50%, [210], [211]. Grâce à une meilleure prise en charge thérapeutique une considérable amélioration est observée puisqu'elle est aujourd'hui comprise entre 59% et 75% chez l'adulte et dépasse les 80% chez l'enfant [143], [148], [207]–[209]. Cependant, une récente étude rétrospective sur plus de 3 000 patients a montré que la survie globale à cette maladie était d'environ 11 ans. Compte tenu du jeune âge des personnes touchées, les années potentielles de vie perdues sont donc importantes dans cette maladie.

Il est nécessaire de continuer à mieux comprendre la biologie de cette maladie afin de pouvoir développer de nouvelles thérapies plus efficaces. Il est également important d'identifier les facteurs influençant le pronostic pour identifier les patients nécessitant une prise en charge plus « extrême ».

Dans la suite de ce chapitre, nous verrons tout d'abord une brève présentation médicale de la maladie et de sa prise en charge thérapeutique actuelle ainsi que les différents marqueurs pronostics qui ont déjà été décrit. Par la suite, nous nous concentrerons sur les mécanismes moléculaires et épigénétiques impliqués dans ce cancer.

3.1 *Présentation médicale de la pathologie*

3.1.1 *Histoire d'une maladie qui porte mal son nom*

Retracer l'histoire de la découverte des tumeurs malignes, comme les SS, est compliqué dû au fait des changements de concept, terminologie, outils de diagnostic et même critères de diagnostic qui évoluent au cours du temps. Néanmoins, en 1914, les Dr S. Fosdick Jones et Ross C. Whitman ont publié une étude de cas sur un sarcome primaire impliquant la membrane synoviale chez une jeune femme de 17 ans [212].

Cette étude est accompagnée d'une revue de la littérature disponible à cette époque et attribue la première observation documentée d'un cas de SS à un médecin allemand en 1865. Il s'ajoute à ce premier, 16 autres cas avérés d'après Jones et Whitman, dans lesquels la notion que ces sarcomes se développent à partir de la membrane synoviale semble être établie. Il est probable que Jones et Whitman soient les premiers à introduire le terme « synovialosarcome » encore utilisé de nos jours. Ironiquement, il semble que la tumeur qu'ils décrivent ne soit pas ce que l'on considère aujourd'hui comme un SS car la description histologique qui en est faite ne correspond pas aux critères actuels [213].

Même s'il est à présent connu que la membrane synoviale ne joue aucun rôle dans l'étiologie de la maladie, le nom SS a été conservé. La confusion vient probablement des similarités morphologiques entre les cellules de ces tumeurs et les synoviocytes, les cellules de la membrane synoviale produisant le liquide de même nom.

3.1.2 Épidémiologie et classification

Le SS est décrit comme un cancer de l'adolescent et du jeune adulte avec 1/3 des tumeurs survenant dans les deux premières décennies de la vie [214] et un âge moyen de diagnostic entre 30 et 39 ans [215], [216]. L'âge du patient au diagnostic est d'ailleurs un facteur pronostic majeur puisqu'il y a un meilleur pronostic chez les enfants que chez les adultes. Smolle *et al.* ont montré que la présentation clinique du SS est identique dans les deux populations et que la taille de la tumeur est indépendante de l'âge [217]. La différence de survie n'est à ce jour pas encore expliquée mais pourrait être due à des variables biologiques encore non-identifiées ou à une prise en charge thérapeutique différente entre ces deux populations [218].

Les SS appartiennent à la famille des sarcomes, des cancers rares des tissus mésenchymateux incluant près de 80 sous-types d'après la dernière classification de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) [219]. Les sarcomes peuvent grossièrement être catégorisés en deux groupes : les ostéosarcomes et les STMs. En Europe, les STMs sont les plus fréquents avec une incidence comprise entre 4-5/100 000 cas/an tandis que celui des ostéosarcomes est <1/100 000 cas/an [220].

Au sein des STMs, 5 à 10% des tumeurs sont des SS. De façon plus précise, d'après la classification de l'OMS, les SS appartiennent à la catégorie des sarcomes de différenciation incertaine qui se divise en trois sous-types : monophasique, biphasique et peu différencié, identifiés sur des bases histologiques [219].

Dans le cas des tumeurs monophasiques, on trouve uniquement des cellules fusiformes mésenchymateuses (**Figure 23 A**). Les tumeurs biphasiques, elles, sont caractérisées par ce même contingent de cellules dans lequel on trouve une proportion variable de cellules épithéliales organisées en structure glandulaire (**Figure 23 B**). Des calcifications locales, avec ou sans ossification, peuvent être trouvées au sein de ces tumeurs, principalement dans le type biphasique [221].

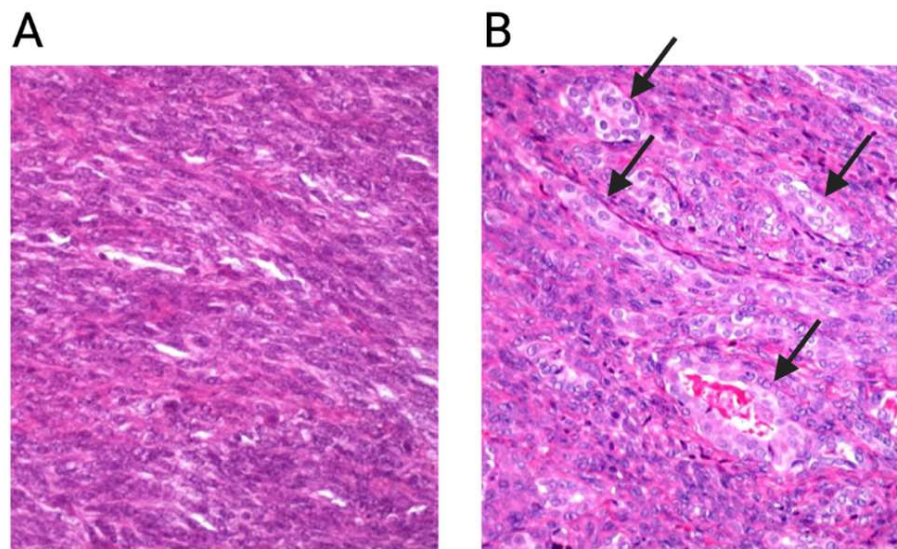


Figure 23 : Coupes histologiques de sarcome monophasique et biphasique

A. Coupe histologique d'un SS monophasique. **B.** Coupe histologique d'un SS biphasique. Les flèches noires indiquent quelques-unes des structures épithéliales glandulaires visibles sur cette coupe.

Enfin, au sein du sous-type des tumeurs peu différenciées, on trouve de nouveau trois sous-types : le premier sous-type, le SS peu différencié à larges cellules, est le plus fréquent. Il se caractérise par de grosses cellules avec un noyau aux contours irréguliers et un cytoplasme très volumineux qui donne une apparence épithélioïde (**Figure 24 A**). Le second, le SS peu différencié à petites cellules, se compose de cellules de petite taille rappelant l'aspect d'autres types de sarcomes tel que le sarcome d'Ewing. Parfois ces cellules s'organisent en rosette à certains endroits de la tumeur (**Figure 24 B**). Enfin, le dernier sous-type se caractérise par un contingent fusiforme, similaire à celui retrouvé dans les types monophasique et biphasique, dont les cellules s'organisent en chevrons. Ce sous-type est associé à une augmentation du taux de mitose et est nommé SS peu différencié de type fusiforme de haut grade (**Figure 24 C**).

Une composante peu différenciée peut-être retrouvée au sein de tumeurs monophasiques ou biphasiques ou alors peut composer la totalité de la tumeur.

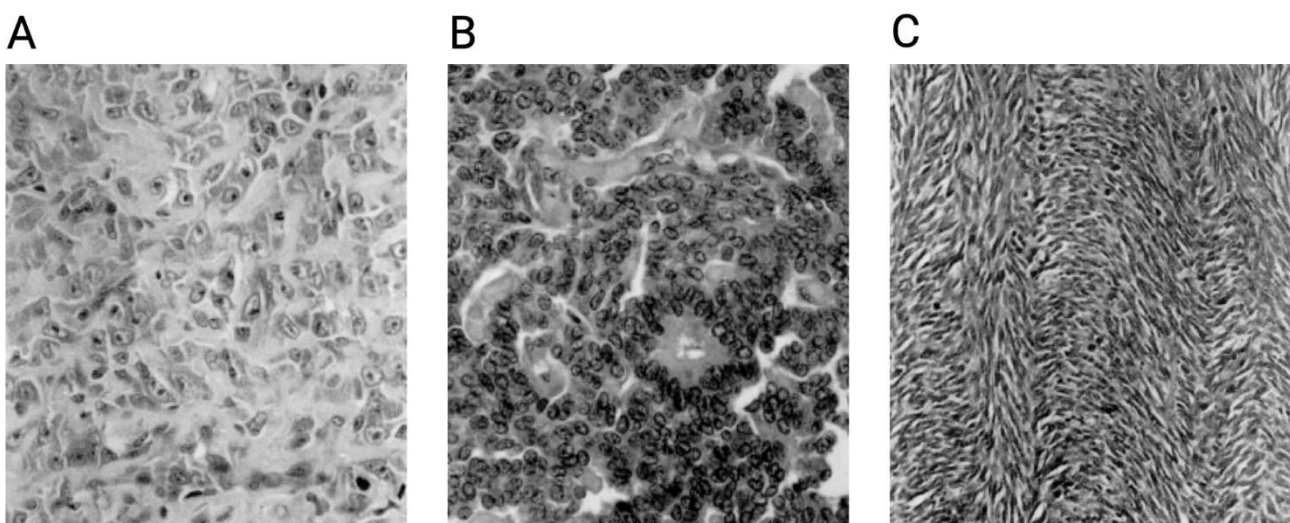


Figure 24 : Coupes histologiques des différents sous-types de synoviosarcomes peu différenciés
A. Coupe histologique d'un SS peu différencié à larges cellules. **B.** Coupe histologique d'un SS peu différencié à petites cellules. **C.** Coupe histologique d'un SS peu différencié de type fusiforme de haut grade. [222]

Le sous-type histologique a été identifié comme un facteur pronostic avéré et les SS biphasiques sont donc les tumeurs possédant le meilleur pronostic [216], [223]. Les cellules de SS sont porteuses d'une translocation pathognomonique $t(X:18)$ dans 95% des cas [224] et qui abouti à la synthèse d'une protéine de fusion *Synovial Sarcoma 18 – Synovial Sarcoma X breakpoint 1/2/4* (SS18-SSX1/2/4)(cf. 3.2 sur l'étiologie de la maladie). D'un point de vue moléculaire, le sous-type histologique a été montré comme corrélé à la nature de la protéine de fusion SS18-SSX avec une prédominance de SS18-SSX1 dans les tumeurs biphasiques et SS18 [225]–[230].

3.1.3 Présentation clinique et diagnostic

Les SS se développent à proximité de structures articulaires (articulation, tendon, bourse) et peuvent se développer à n'importe quel endroit du corps. Des cas de SS sont donc détectés dans la région tête/cou, du thorax, de l'abdomen, du pelvis... Cependant, la majorité des tumeurs se localisent dans les membres inférieurs, à proximité du genou [216], [218],

[231], [232]. Une localisation en dehors de la région tête/cou a d'ailleurs été identifiée comme un facteur de mauvais pronostic [216].

Contrairement à la majorité des STMs qui se présentent sous la forme de larges masses indolores et à croissance rapide, la plupart des SS ont une croissance lente généralement associée à des douleurs. La durée moyenne des symptômes est cependant d'environ 2 ans avant que le diagnostic de SS ne soit posé. Au cours de ces 2 ans, la survenue de douleur localisée et une sensibilité à la palpation avant même l'apparition d'un gonflement ou d'une masse palpable a été soulignée dans plusieurs études et permettrait d'ailleurs une détection plus précoce de la maladie [233].

Le délai de diagnostic s'explique par le caractère insidieux des symptômes qui ne pousse les patients à consulter un médecin que dans seulement 30% des cas. De plus, seulement la moitié des cas présente des symptômes cohérents avec un sarcome des tissus mous d'après les directives médicales nationales. Ces cancers sont donc généralement, dans un premier temps, diagnostiqués à tort par les praticiens comme des maladies bénignes telles que des inflammations des structures articulaires [234].

L'établissement d'un diagnostic de SS ne se fait qu'après plusieurs examens incluant des examens d'imagerie et en laboratoire.

3.1.3.1 Examens d'imagerie

Plusieurs examens tels que la radiographie ou la tomodensitométrie peuvent être utilisés pour orienter le diagnostic vers le SS. Cependant, l'Imagerie à Résonance Magnétique (IRM) reste l'examen de référence pour le diagnostic par imagerie de ces tumeurs.

L'apparence des SS par IRM est variée allant de petits nodules homogènes à de larges masses hétérogènes emprisonnant des nerfs et des vaisseaux. L'IRM peut également apporter des informations pronostic en permettant d'identifier les tumeurs dites « à triple signal » dont le pronostic est moins favorable. Ces tumeurs à triple signal présentent un signal particulier où l'on retrouve des signaux de forte, moyenne et faible intensité au sein de la même lésion lorsque l'image est pondérée en T2 (*i.e.* quand l'eau apparaît en couleur claire et la tumeur apparaît alors de couleur intense dans le cas des SS) [235].

Les examens d'imagerie permettent également de fournir des informations précieuses concernant le pronostic : une distribution proximale, l'absence de calcification, la présence de kyste, d'hémorragie et d'un triple signal au sein de la tumeur sont des marqueurs d'une tumeur d'un grade élevé et donc corrélé à un mauvais pronostic [236]. Ils permettent également de déterminer la présence de métastases qui influence fortement le pronostic du patient. En effet, en cas de métastases au moment du diagnostic, le pronostic est drastiquement impacté avec une survie globale à 5 ans < 20% [216].

3.1.3.2 Examens en laboratoire

Bien que l'imagerie soit capable d'orienter le praticien vers un diagnostic de SS, seul une biopsie permet de différencier les SS des autres STMs et de définir le grade de la tumeur. Les analyses par ImmunoHistoChimie (IHC) des lames issues de la biopsie sont encore largement utilisées pour appuyer un diagnostic de SS cependant l'analyse moléculaire des cellules pour la détection de la protéine SS18-SSX pathognomonique de la maladie est la technique la plus fiable pour poser un diagnostic.

3.1.3.2.1 Analyse par immunohistochimie

A l'heure actuelle, en routine, il n'existe pas de marqueur unique ou de combinaison de marqueurs capable de totalement confirmer ou exclure un diagnostic de SS. La suite de ce paragraphe présente une liste non-exhaustive des marqueurs communément utilisés.

3.1.3.2.1.1 Marqueurs les plus communs

Parmi les marqueurs les plus communément utilisés en routine et qui permettent l'identification des tumeurs biphasiques, on trouve 1-les cytokératines (CK) et 2- l'antigène épithélial membranaire (EMA)[154]. Le marquage CKs et EMA est plutôt ponctué dans le compartiment des cellules fusiformes tandis qu'il est homogène dans les compartiments épithéliaux. Il est important de noter que ces mêmes marqueurs peuvent être trouvés dans d'autres tumeurs à cellules fusiformes comme certains rhabdomyosarcomes ou des tumeurs des nerfs périphériques. Cependant, CK7 et 19 semblent être plus spécifiques des SS [155].

Bcl-2 est également un marqueur utilisé dans le diagnostic des SS. Il est présent dans la plupart de ces tumeurs et absent d'autres sarcomes à cellules fusiformes avec lesquels il peut être confondu [156].

L'expression de CD99 tout comme la protéine S-100 est également détectée par IHC dans les tumeurs de SS mais également dans d'autres pathologies telle que les sarcomes d'Ewing [154].

Enfin, comme beaucoup de STMs, les SS expriment une forte quantité de récepteurs à tyrosine kinase notamment les Récepteurs aux Facteurs de Croissance de l'Endothélium Vasculaire (VEGF-R) et aux Récepteurs aux Facteurs de Croissance Dérivés des Plaquettes (PDGF-R) mais également ceux à la protéine c-kit. Plusieurs thérapies ciblées contre ces récepteurs sont d'ailleurs en cours d'essai clinique dans ces cancers (cf. **3.1.4.4.1**).

3.1.3.2.1.2 Transducin-Like Enhancer of Split 1

Transducin-Like Enhancer of split 1 (TLE1) se voit augmenté dans les SS et est considéré comme un biomarqueur permettant de différencier les SS des autres STMs [157]. En effet, plusieurs études ont confirmé l'expression de TLE1 dans plus de 90% des SS et dans au moins 50% des cellules de la tumeur [157]–[159]. Cependant, l'expression de ce marqueur dans d'autres cancers pouvant faire partie du diagnostic différentiel d'un SS comme par exemple les schwannomes, les rhabdomyosarcomes ou encore les neurofibromes, a été détectée dans 1/3 des cas [158]. Le niveau d'expression de TLE1 modéré ou élevé peut être utile pour distinguer les SS d'autres tumeurs histologiquement proches. Cependant, il doit impérativement être utilisé seulement au sein d'un panel d'autres anticorps spécifiques d'autres biomarqueurs des SS.

3.1.3.2.1.3 New-York-Esophageal Squamous Cell Carcinoma-1

New-York Esophageal Squamous Cell Carcinoma-1 (NY-ESO-1) est un antigène des cancers des testicules qui se trouve être exprimé, en général de façon élevée et homogène, dans 75 à 80% des SS, quel que soit leur type histologique. Cette expression est rarement retrouvée dans d'autres tumeurs mésenchymateuses à cellules fusiformes ce qui en fait un bon marqueur des SS [160], [161]. Cependant, comme TLE1, il ne peut être utilisé comme

biomarqueur unique mais au sein d'un panel. La protéine *Synovial Sarcoma X Breakpoint* (SSX), faisant parti de la protéine SS18-SSX est une protéine exprimée dans les testicules. Bien qu'aucun lien n'ait été décrit, il est tout de même intéressant de relever cette similitude.

3.1.3.2.2 Analyse moléculaire des cellules

La détection des protéines de fusion SS18-SSX est validée par la technique de *Fluorescence In Situ Hybridization* (FISH) et par *Reverse Transcription quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction* (RT-qPCR). Ces deux techniques sont hautement spécifiques et présentent des sensibilités de 82% et 94% respectivement. Cependant, dans une étude de 50 cas de tumeurs, les résultats obtenus après l'utilisation de ces deux techniques n'étaient pas concordant que dans 38 d'entre eux, l'utilisation des deux méthodes est donc recommandée dans le diagnostic, donnant alors une sensibilité de 96% et une spécificité de 100% [237].

Ainsi malgré leur coût élevé, leur difficulté d'accès dans certains centres d'analyse et leur caractère chronophage, la FISH et la RT-qPCR sont les examens de référence pour la pose d'un diagnostic de SS. Toutefois, les choses seront amenées à changer prochainement avec le développement récent d'un anticorps permettant de détecter la protéine de fusion SS18-SSX par IHC avec une sensibilité de 95% et une spécificité de 100% [164]. Cet anticorps a d'ailleurs été validé comme outil diagnostique fiable par une équipe indépendante sur une cohorte de 39 patients présentant ou non des SS [165] mais également dans le diagnostic des métastases pulmonaires associées à ces tumeurs [166].

3.1.4 Traitements

A l'issue du diagnostic, une prise en charge thérapeutique du patient est alors mise en place. Le traitement standard des SS reste la chirurgie éventuellement associée à des rayons ou de la chimiothérapie. Dans la suite de ce paragraphe, nous verrons plus en détail ces traitements, les controverses associées ainsi qu'une liste non-exhaustive de traitements en cours de développement.

3.1.4.1 Chirurgie

Historiquement, les patients étaient souvent traités par une amputation du membre porteur de la tumeur primaire mais les progrès en thérapie néo-adjuvante ainsi qu'en imagerie ont peu à peu permis un traitement par des chirurgies conservatrices sans que cela n'impacte le risque de récurrence locale [172]. L'intérêt des chirurgies conservatrices est de contrôler la tumeur tout en permettant au patient de garder un membre fonctionnel à l'issue de l'opération.

Malgré les progrès thérapeutiques, la chirurgie reste la pièce maitresse de la prise en charge thérapeutique des SS et la présence de marges de résections négatives, c'est-à-dire la présence de tissus sains sur les bords après excision de la tumeur, est l'élément crucial garantissant le succès du traitement. C'est de cela que dépendra l'absence de récurrence locale de la maladie et l'amélioration de la survie globale [238], [239]. Une marge négative d'au moins 1cm est nécessaire pour diminuer le risque de récurrence [239].

3.1.4.2 Radiothérapie

Des études sur de larges bases de données ont montré un bénéfice pour les patients d'un traitement par radiothérapie et notamment sur la survie globale [240]–[242]. A l'heure actuelle, la RadioThérapie à Intensité Modulée (IMRT) est la méthode préconisée pour le traitement des SS [243], [244]. L'IMRT permet de délivrer une dose de radiation plus intense et plus localisée, réduisant ainsi le volume de radiations reçues par les tissus sains adjacents. Ce traitement peut être administré en pré ou post-opératoire.

Bien que les radiations pré-opératoires soient associées à des difficultés de cicatrisation après l'opération, leur intérêt majeur est de diminuer le risque de propagation de cellules cancéreuses dans le corps à la suite de la manipulation de la tumeur durant l'opération [243]. En effet, la pseudocapsule entourant la tumeur épaissie et devient acellulaire, la résection tumorale est alors facilitée et diminue le risque de récurrence. La radiothérapie néoadjuvante est également recommandée dans le cas des tumeurs larges (>5cm) et si l'on sait déjà que les marges de résection seront faibles afin de préserver une structure neurovasculaire majeure ou un os [243].

Concernant la radiothérapie post-opératoire, son efficacité et son intérêt sont à ce jour débattus au sein de la communauté médicale. En effet, si certaines études montrent un rôle essentiel pour diminuer le risque de récurrence locale lorsque des marges saines n'ont pas pu être obtenues [245], une étude rétrospective a, au contraire, montré son absence de bénéfices cliniques [246]. Les indications pour la radiothérapie sont généralement beaucoup plus restreintes dans la population pédiatrique [247]. C'est pourquoi les enfants reçoivent plutôt un traitement à base de chimiothérapie.

3.1.4.3 Chimiothérapie

Contrairement à la majorité des STMs, les SS semblent plus sensibles à la chimiothérapie [248]. Cependant, le traitement par chimiothérapie reste controversé car plusieurs études montrent des résultats contradictoires [249]–[253]. La nécessité d'identifier le sous-groupe de patients pouvant tirer le meilleur bénéfice d'un traitement systémique est donc avérée.

Il semble que les enfants et adolescents présentant des tumeurs à risque intermédiaire ou élevé (*i.e.* >5cm, invasion des ganglions, marges de résection positives) tirent un meilleur bénéfice de ce traitement qui est généralement une combinaison de doxorubicine et d'ifosfamide [247], [254]. Cependant, elle ne semble pas nécessaire dans les tumeurs à risque faible [255].

La controverse concernant l'utilité d'un tel traitement se trouve plutôt chez l'adulte où il est à l'heure actuelle préconisé pour les patients présentant une tumeur à haut risque ou des maladies avancées [248], [256]. Le traitement de référence reste la doxorubicine associée à l'ifosfamide avec un taux de réponse de 25 à 60% [249], [257].

Ainsi, Ferrarie *et al.* montrent une augmentation de presque 20% de la survie sans métastases à la suite d'un traitement à la chimiothérapie avec un bénéfice plutôt chez les patients de plus de 17 ans [250]. Edmonson *et al.* montrent une régression partielle chez 5 patients sur 12 présentant une maladie résiduelle, récurrente ou métastasée [258]. En revanche, le « Groupe Sarcome Français » a montré une absence de bénéfice d'une chimiothérapie adjuvante ou néo-adjuvante chez les adultes [251]. La base comparative de ces résultats n'est pas identique car les patients inclus dans l'étude, présentent des tumeurs

à faibles risques qui, ne sont pas ceux décrits comme tirant le plus de bénéfices d'un traitement systémique. Enfin, chez les patients présentant une maladie avancée, Spurrell *et al.* montrent une survie médiane meilleure avec la combinaison de chimiothérapie plutôt que par les agents thérapeutiques seuls [253].

En 2017, l'intérêt thérapeutique de l'évofosfamide, un agent injecté sous forme de prodrogue et activé par l'hypoxie, a été évalué dans un essai clinique de phase III chez des patients atteints de STMs [259]. Une augmentation de la survie globale a été observée uniquement chez les patients atteints de SS, cependant comme le nombre de patients affectés par cette pathologie au sein de l'étude est faible, de nouvelles investigations sont nécessaires afin de pouvoir établir un bénéfice thérapeutique de l'évofosfamide.

La nature des traitements de la maladie présentés dans ce paragraphe joue donc un rôle clé dans le pronostic. Cependant, les aptitudes du centre dans lequel les traitements sont effectués est également important. En effet, Blay *et al.* ont récemment montré que, en France, le risque de rechute et de décès est diminué lorsque le traitement par chirurgie est réalisé dans un centre de référence. En effet, dans de tels centres, le succès de l'exérèse de la tumeur (c'est-à-dire l'obtention de marges saines) est 50% plus élevé que dans d'autres centres [260].

De plus, les SS sont des tumeurs à part au sein des sarcomes des tissus mous car les récurrences locales et les métastases apparaissent plus tardivement avec une récurrence locale moyenne à 3,6 ans et un temps d'apparition moyen des métastases de 5,7 ans alors que la rechute a généralement lieu dans les 2 ans qui suivent le traitement pour les autres sarcomes des tissus mous [261], [262]. Ainsi, les SS nécessitent un suivi adapté sur le long terme qui jouera sur le pronostic du patient.

3.1.4.4 Axes thérapeutiques en développement

Malgré les traitements présentés précédemment et leur évolution, le pronostic de ce type de tumeur reste assez sombre. Ainsi, le développement de nouvelles thérapies est essentiel pour améliorer l'issue de la maladie et une liste non-exhaustive est présentée ci-dessous.

3.1.4.4.1 Thérapies ciblées

Les Inhibiteurs des Tyrosine Kinases (TKI) ont été décrits comme possédant une activité dans les SSs, notamment deux molécules ciblant les VEGF-R et PDGF-R. Ainsi le Pazopanib (inhibiteur de VEGF-R/PDGF-R/c-KIT-R, *GlaxoSmithKline*), qui cible également le récepteur à la protéine c-KIT en plus de VEGF-R et PDGF-R, a montré une activité thérapeutique dans les SS métastatiques et réfractaires avec par exemple une amélioration de la survie sans progression médiane de 3 mois dans des essais cliniques de phase II et III [263], [264]. Le regorafenib (poly-TKI, *Bayer Pharma*) quant-à-lui a également montré un effet similaire avec cette fois une survie sans progression augmentée de 4 mois chez les patients traités [265]. AL3818 (*Chia-tai Tianqing Pharmaceutical*), un nouveau TKI, montre également des résultats prometteurs avec une amélioration de la survie sans progression satisfaisante par rapport à un agent chimiothérapeutique, la dacarbazine [266].

Une nouvelle classe de médicament capable d'inhiber la protéine *Enhancer of Zeste 2 Polycomb Repressive Complex 2 subunit* (EZH2), sous unité catalytique du complexe *Polycomb Repressive Complex* (PRC) 2, semble également prometteuse au vu du rôle clé de PRC2 dans

la biologie de la maladie comme nous le verrons dans le paragraphe **3.6.2**. Un essai clinique est actuellement en cours (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT02601950>) et les résultats sont à venir.

Anaplastic Lymphoma Kinase a été identifiée *in vitro* comme une cible thérapeutique potentielle tout comme les kinases dépendantes des cyclines CDK4 et CDK6 [267], [268]. De même, les protéines *Mammalian Target of Rapamycin*, AKT, 4^E-Binding Protein 1 ou encore les protéines de la voie Wnt semblent des cibles prometteuses pour des thérapies ciblées [269], [270].

La *BromoDomain-containing protein 9* (BRD9) a récemment été identifiée comme étant essentielle au développement des SS. Des résultats *in vitro* montrent que sa dégradation est associée à une inhibition de la progression tumorale *in vivo* [1]. Ces prometteuses observations ont mené au développement de *PROteolysis-TArgeting Chimeras* (PROTACs), des petites molécules bi-fonctionnelles conçues pour induire la dégradation par le protéasome de leurs cibles incluant BRD9. Deux essais cliniques sont actuellement en cours avec ces PROTACs mais les résultats ne sont pas encor[271]□.

3.1.4.4.2 Immunothérapies

Les immunothérapies les plus connues sont celles ciblant les interactions entre PD-1/PDL-1 et celles dirigées contre Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Antigen 4. Cependant, il s'avère que les SS sont les sarcomes exprimant le moins PD-1/PD-L1 et ayant l'infiltration de lymphocyte T la plus faible [272]. Cela explique les résultats décevants des différents essais cliniques réalisés chez l'Homme avec ces thérapies [273], [274].

En revanche, des résultats prometteurs en phase I ont été observés grâce à une thérapie basée sur des lymphocytes T modifiés qui vont reconnaître la protéine NY-ESO-1 (présentée dans le paragraphe biomarqueurs **3.1.3.2.1.3** plus haut). Deux essais cliniques de phase I, menés par GlaxoSmithKline et le centre médical d'Hadassah (Jérusalem, Israël), ont montré un nombre satisfaisant de réponses objectives parmi lesquelles une réponse complète [275], [276]. Ce traitement est actuellement poursuivi en phase II. D'autres protéines appartenant à la famille des antigènes des cancers des testicules sont également exprimés dans les SS et à l'étude pour servir de cible à des thérapies similaires [277].

3.1.4.4.3 Traitement métabolique

Une nouvelle approche intéressante pour le traitement des SS, basée sur une altération du métabolisme des cellules cancéreuses, a récemment été mise en lumière. La protéine *Arginino-Succinate Synthetase 1* (ASS1) est une enzyme limitante du cycle de Krebs pour la formation d'arginine-succinate. En cas d'absence d'expression d'ASS1, les cellules deviennent dépendantes de sources extracellulaires d'arginine pour maintenir leur métabolisme. Dans les SS, une perte de l'expression de ASS1 a été montrée comme étant fréquente [278]. Une thérapie avec une enzyme telle que la déiminase de l'arginine pégylée permet alors de dépléter l'arginine du milieu altérant alors le métabolisme de la cellule cancéreuse [279]. Cette thérapie prometteuse est encore en développement à l'heure actuelle mais a fait l'objet d'un essai clinique de phase I dans les mélanomes et autres tumeurs solides dont les résultats sont encourageants [280].

3.2 *Étiologie de la maladie : un chaos épigénétique induit par SS18-SSX*

Comme précédemment cité, les SS sont caractérisés par une protéine de fusion SS18-SSX -également retrouvée sous son ancien nom SYT-SSX dans la littérature- qui est pathognomonique de ces tumeurs. Le paragraphe suivant a pour but de faire un état de l'art sur les mécanismes oncogéniques induits par SS18-SSX, notamment à un niveau épigénétique.

3.2.1 *Rappels d'épigénétique*

Le terme épigénétique désigne les processus moléculaires permettant de moduler l'expression des gènes sans induire de changements de la séquence ADN et notamment via une modulation de la structure de la chromatine. Ainsi, plusieurs processus sont mis en jeu : les modifications post-traductionnelles des queues d'histones, l'action de facteurs de remodelage de la chromatine, la méthylation de l'ADN et l'action d'ARNs non codants.

Dans la suite de ce chapitre, nous aborderons quelques notions de base sur la chromatine puis nous verrons brièvement les processus de régulation de sa compaction et les acteurs de cette régulation. Ce paragraphe n'a pas pour vocation de présenter de façon exhaustive le domaine de l'épigénétique dans toute la complexité qui le caractérise mais seulement de présenter brièvement des concepts clés et les acteurs impliqués dans le processus oncogénique des SS qui seront utiles pour la partie résultats de ce manuscrit.

3.2.1.1 La chromatine et les histones

3.2.1.1.1 Structure de la chromatine

Au sein de chaque cellule, l'information génétique est contenue dans plus de 2m d'ADN localisé dans l'espace de moins de 10µm que représente le noyau [281]. L'ADN y est condensé sous forme d'une structure dynamique appelée chromatine. Selon son niveau de compaction, on distingue l'euchromatine de l'hétérochromatine (**Figure 25**).

L'euchromatine correspond à la forme la moins condensée et est transcriptionnellement active. Elle représente environ 4% du génome des mammifères et est principalement retrouvée dans des régions riches en gènes.

L'hétérochromatine quant à elle est transcriptionnellement inactive, sa compaction empêchant l'accès à la machinerie cellulaire pour l'expression des gènes. Deux types d'hétérochromatine ont été décrits : l'hétérochromatine constitutive et l'hétérochromatine facultative [282]. L'hétérochromatine constitutive est inaccessible tout au long du cycle cellulaire, on la retrouve dans des régions dénuées de gènes et riches en séquence répétées comme les régions péri-centromériques et télomériques des chromosomes. L'hétérochromatine facultative peut quant à elle se décondenser en euchromatine sous certaines conditions et permet ainsi une régulation temporelle et spatiale de certains loci.

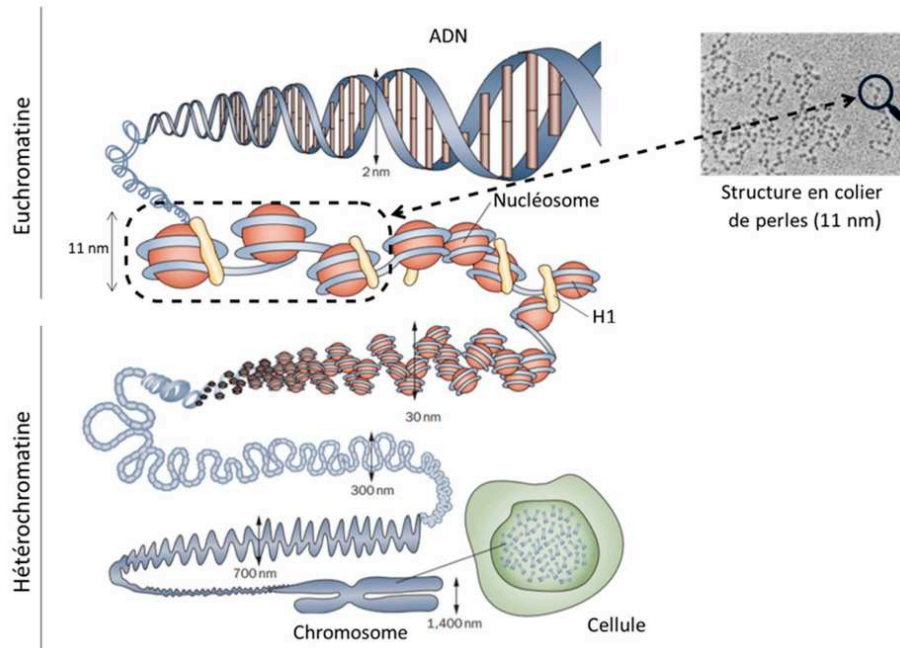


Figure 25 : Représentation schématique des différents niveaux de compaction de la chromatine.
Tiré de Tonna et al. (2010)

3.2.1.1.2 Le nucléosome

L'unité fonctionnelle de base de la chromatine est le nucléosome composé d'ADN et de protéines histones (**Figure 26**). Les histones sont de petites protéines chargées positivement qui vont ainsi pouvoir interagir avec l'ADN chargé négativement et permettre sa compaction. On distingue cinq protéines histones majoritaires : H1, H2A, H2B, H3 et H4.

Le nucléosome dit cœur se compose ainsi de 147 paires de bases (pb) d'ADN enroulé autour d'un octamère d'histone, lui-même composé de deux dimères d'H2A/H2B et d'un tétramère d'H3/H4 [283]. Très conservées au cours de l'évolution, ces histones possèdent une extrémité N-terminale flexible et peu structurée, riche en lysines (K) et arginines (R) nommée queue histone. C'est sur cette dernière que seront déposées les Modifications Post-Traductionnelles (MPTs) permettant une modulation de la compaction de la chromatine que nous verrons plus tard (cf. **3.2.1.2.1**).

L'histone H1 quant à elle maintient l'ADN enroulé autour du nucléosome cœur. Chaque cœur est relié à son voisin par environ 20 pb d'ADN appelé ADN de liaison. Ainsi, c'est l'ensemble du nucléosome cœur, d'H1 et de l'ADN de liaison qui est désigné par le terme nucléosome.

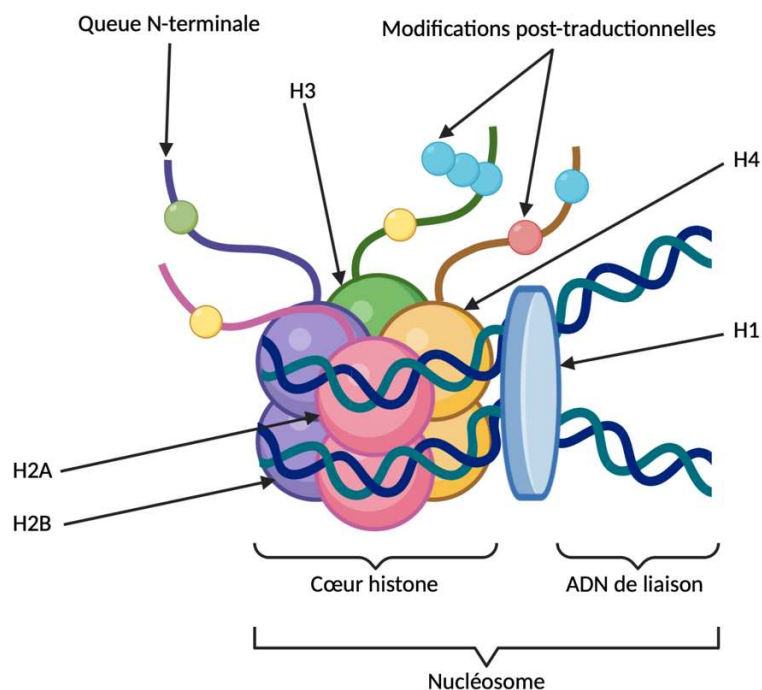


Figure 26 : Représentation schématique du nucléosome

3.2.1.2 Modulation de l'expression génique par la modification des protéines histones

3.2.1.2.1 Le code histone

Comme précédemment évoqué, les queues histones peuvent être modifiées par des MPTs qui se caractérisent par l'ajout via une liaison covalente de petits groupements chimiques ou de petites protéines. Parmi les modifications les plus connues, on trouve l'acétylation, la méthylation ou encore la phosphorylation qui peuvent être déposées sur plusieurs acides aminés particuliers de la queue histone [284].

Ces ajouts sont catalysés par des enzymes spécifiques à chacune de ces modifications : les enzymes déposant les marques sont appelées les « writers » tandis que celles qui les effacent sont les « erasers ». On appelle « readers » les effecteurs qui vont détecter ces marques. Au total, plus de 150 protéines modifiant les histones ont été identifiées [285].

Les MPTs des histones influencent de nombreuses façons la conformation et l'architecture de la chromatine, formant ainsi le code histone [284]. Elles peuvent par exemple avoir un impact direct en modifiant les interactions entre les histones et l'ADN ou bien l'interaction des nucléosomes entre eux. Elles peuvent également moduler le recrutement et l'interaction avec l'ADN d'autres facteurs de remodelage de la chromatine mais aussi avec d'autres complexes comme le complexe de réparation de l'ADN. Ainsi, les MPTs des histones régulent des processus fondamentaux tels que la transcription, la réplication ou encore la réparation de l'ADN. Leur dérégulation, retrouvée au sein de nombreuses tumeurs, peut aboutir à l'activation inappropriée d'oncogènes ou au contraire l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs. Les MPTs les plus fréquentes, leurs acteurs et leurs effets sur la chromatine sont résumées dans le **Tableau 3** ci-dessous.

MPT d'histone	Résidus affectés	Effet(s) sur le résidu	Writer	Eraser
Acétylation	K	Neutralisation de la charge positive	HAT	HDAC
Méthylation	K R	Encombrement stérique Ajout d'hydrophobicité	HKMT PRMT	KDM
Phosphorylation	S T Y H	Addition d'une charge négative	Kinase	Phosphatase

K : Lysine
 R : Arginine
 S : Sérine
 T : Thréonine
 Y : Tyrosine
 H : Histidine

HAT : Histone AcétylTransférase
 HKMT : Histone Lysine MéthylTransférase
 PRMT : Protéine Arginine MéthylTransférase
 HDAC : Histone DéACétylase
 KDM : Lysine DÉMéthylase

Tableau 3 : Modifications post-traductionnelles des histones, acteurs et effets sur la chromatine

Les marques histones les plus fréquentes sont répertoriées dans le **Tableau 4** ci-dessous. La notation indique le numéro de l'histone concernée suivi de la nature et de la position de l'acide aminé concerné et enfin la nature de la modification. Ainsi, par exemple, H3K4me3 indique une triméthylation de lysine 4 de l'histone H3.

Marque histone	Fonction	Localisation privilégiée
H3K4me1	Activation	Enhancers
H3K4me3	Activation	Promoteurs, domaines bivalents
H3K36me3	Activation	Corps des gènes
H3K79me2	Activation	Corps des gènes
H3K9Ac	Activation	Enhancers, promoteurs
H3K27Ac	Activation	Enhancers, promoteurs
H4K16Ac	Activation	Séquences répétées
H3K27me3	Répression	Promoteurs, régulateurs du développement, domaines bivalents
H3K9me3	Répression	Télomères, péricentromères
H3S10P	Réplication de l'ADN	Chromosome mitotique

Tableau 4 : Principales marques histones et enzymes associées.

Activation et Répression indiquent des modifications au niveau de la transcription.

Outre les MPTs des histones, on peut également noter l'existence d'un processus permettant la substitution des protéines histones canoniques du cœur du nucléosome par des variants de ces protéines, permettant alors une modulation différente de la chromatine. Ce processus est médié par des protéines dites chaperonnes et les complexes de remodelage de la chromatine. N'ayant pas été étudié dans le contexte des SS, ce processus ne sera pas détaillé dans ce manuscrit.

3.2.1.2.2 La chromatine bivalente, un état particulier

Dans les années 2000, une structure chromatinienne atypique a été décrite [286]. Elle se caractérise par un co-enrichissement de H3K27m3 (marque de répression de la transcription) et de H3K4me3 (marque de l'activation de l'expression génique) essentielle pour une transcription efficace, et a ainsi été caractérisée comme étant « bivalente ». Identifiée dans les cellules souches embryonnaires, il a été proposé que cet état hybride permettrait une activation rapide des gènes jouant un rôle décisionnel dans l'acquisition d'une identité cellulaire. Cette structure a ensuite été retrouvée dans les cellules différenciées et dans des promoteurs de gènes impliqués dans la résistance des cellules tumorales à la chimiothérapie [287], [288].

Kumar *at al.* ont cependant montré que les gènes possédant un promoteur bivalent ne s'activent ni plus vite ni de façon plus forte que les autres [289]. Au cours de leurs expériences, ils ont constaté que, dans les cellules cancéreuses, deux-tiers des gènes hyperméthylés sont des gènes présentant une chromatine bivalente dans les cellules souches embryonnaires et qu'ils sont majoritairement des cibles de PRC2, complexe présenté dans le paragraphe suivant **3.2.1.5.1**. Deux hypothèses ont alors été présentées. Kumar et ses collègues suggèrent que la configuration bivalente de la chromatine protège les promoteurs des gènes d'une méthylation et donc d'une répression définitive et que c'est la perte de la marque H3K4me3 qui augmente la probabilité de ces promoteurs à la méthylation. Ohm *et al.* quant à eux supposent que c'est la bivalence de la chromatine ou la présence de PRC2 qui pré-dispose ces régions à la méthylation [290].

Des recherches complémentaires sont donc encore nécessaires afin de comprendre le rôle de la bivalence chromatinienne. On note cependant que cet état particulier de la chromatine semble jouer un rôle dans les SS, les gènes bivalents se trouvant y être particulièrement activés comme par exemple *Paired box gene 3* (Pax3) [291].

3.2.1.3 Modulation de l'expression génique par la méthylation de l'ADN

La méthylation de l'ADN consiste en l'ajout d'un groupement CH₃ sur les deux brins d'ADN via une liaison covalente au niveau des cytosines de dinucléotides CpG, c'est-à-dire une cytosine (C) suivie d'une guanine (G) [292]. Cette méthylation, catalysée par des DNA MéthylTransférases, est associée à une répression de l'expression des gènes.

Chez l'Homme, 70 à 80% des CpG sont méthylés [293]. La méthylation de l'ADN étant associée à une répression stable et durable de l'expression génique, ces derniers se localisent au niveau de régions transcriptionnellement silencieuses telles que les centromères, les télomères et les éléments transposables. Ces régions sont d'ailleurs associées à l'hétérochromatine, qu'elle soit constitutive ou facultative. La méthylation de l'ADN est ainsi impliquée dans des processus tel que l'inactivation du chromosome X ou la répression transcriptionnelle spécifique de chaque tissu. Malgré le caractère pérenne de cette modification, une déméthylation de l'ADN est tout de même possible, soit de façon passive via une dilution de la méthylation au cours de la réplication de l'ADN soit de façon active par les enzymes TET (ten-eleven translocation).

Bien que la majorité des CpG sont méthylés, on trouve dans le génome des régions riches en CpG et pourtant hypométhylées appelées Îlots CpG (CGIs). Ces îlots sont des régions de l'ADN caractérisées par une longueur d'au moins 200 pb avec un pourcentage de GC de plus de 50% et une fréquence de CpG d'au moins 60% [294]. Les CGIs sont associés à 60 voir

70% des promoteurs et leur absence de méthylation suggèrent une expression génique [295]. Cependant, l'absence de méthylation n'entraîne pas une expression systématique du gène, d'autres processus plus facilement modulables, comme les modifications des protéines histones, pouvant intervenir pour la réprimer.

Dans les cancers, des études ont montré une hypométhylation globale de l'ADN avec des hyperméthylations des CGI de façon générale [295]. La méthylation de l'ADN dans le cas des SSs est peu décrite, il semble toutefois que les CpG y soient particulièrement hypométhylés [296].

3.2.1.4 Modulation de l'expression génique par les ARN non-codants

Outre les différents mécanismes présentés ci-dessus, le paysage épigénétique cellulaire peut également être modifié par d'autres acteurs tel que les ARN non-codants. La suite de ce paragraphe présente brièvement ces acteurs dont les rôles oncogéniques mais également thérapeutiques sont de plus en plus investigués.

Les ARNs non-codants désignent une famille de molécules d'ARN plus ou moins longue non traduite et capable de moduler l'expression des gènes de multiples façons [297]. Les miRNA, les ARNs longs non-codants et les ARNs circulaires font par exemple partie de cette famille. La modulation de l'expression génique par ces ARNs passe par plusieurs mécanismes allant, entre autres, de l'inhibition de la transcription à l'interaction directe avec les ARN messagers pour empêcher leur traduction en passant par la dégradation de protéines clés de la modulation du paysage épigénétique. Une expression aberrante des ARNs de cette famille est d'ailleurs associée au développement et à la progression de nombreux cancers.

Les études sur les ARNs non codants au sein des SS sont peu nombreuses. On note cependant des études récentes qui ont mis en lumière un rôle oncogénique de plusieurs miRNAs dans les SS [298]–[300]. Des rôles de biomarqueurs et des effets anti-cancéreux y ont également été décrits pour d'autres miRNAs [301], [302].

3.2.1.5 Modulation de l'expression génique par les protéines Polycomb et Tritorax

Comme déjà présenté précédemment, les régulations épigénétiques font partie des mécanismes clés permettant la régulation du destin cellulaire, notamment au cours du développement. Parmi les acteurs de la modulation du paysage épigénétique, on trouve les protéines très conservées au cours de l'évolution des groupes *Polycomb* (PcG) et *Tritorax* (Trx) dont les rôles antagonistes respectifs de répression et d'activation de la transcription représentent le système de régulation principal du paysage chromatinien [303].

Ces deux groupes de protéines ont été découverts au cours de la deuxième moitié du 20^{ème} siècle, notamment via leurs rôles dans les régulations des gènes homéotiques intervenant au cours du développement. Les recherches intenses de ces dernières années ont mis en évidence une importante diversité fonctionnelle assurée par une variété de complexes PcG et Trx s'assemblant de façon spécifique pour modifier leurs gènes cibles qui ne se limitent pas aux gènes homéotiques.

Chez les mammifères, ce sont les gènes dont les CGI sont hypométhylés qui sont ciblés par ces complexes et leur régulation peut se faire via une modification des histones ou un remodelage de la chromatine.

Dans la suite de ce paragraphe nous verrons brièvement quelques membres de ces groupes de protéines dont l'implication dans les SS a été décrite dans la littérature.

3.2.1.5.1 Les protéines Polycomb

Les complexes PcG sont des complexes impliqués dans le maintien d'un état transcriptionnellement inactif de la chromatine. Les analyses biochimiques ont montré que ces facteurs agissent au niveau des gènes cibles sous la forme de complexes multimériques appelés PRC qui vont ajouter des MPTs sur les histones [304].

3.2.1.5.1.1 PRC1 & PRC2

Au sein des PcG, on distingue deux complexes principaux, PRC1 et PRC2 qui diffèrent par leur activité et leur composition.

Les PRC1 sont divisés en deux sous-groupes, les complexes canoniques cPRC1 et les complexes non-canoniques ncPRC1. Quel que soit leur catégorie, les PRC1 possèdent tous un cœur protéique commun composé d'une des six protéines *Polycomb Ring Finger 1-6* (PCGF1-6) et de la protéine Ring Finger Protein 1 A/B. Cette dernière possède une activité E3 ubiquitine ligase catalysant l'ajout de la marque H2AK119ub sur les histones des nucléosomes présents dans l'ADN à côté desquels ces complexes se fixent. A ce jour, sept complexes PRC1 différents ont été identifiés et leur composition est schématisée dans la **Figure 27**.

Les PRC2 sont au nombre de deux et partagent un cœur protéique composé des protéines *Enhancer of Zeste 1/2* (EZH1/2), *Embryonic Ectoderm Development* (EED), *Suppressor of Zeste 12* (SUZ12) et *RetinoBlastoma-Binding Protein 4/7* (RBBP4/7). Ce cœur protéique va ensuite s'assembler avec d'autres protéines pour former les complexes PRC2.1 et PRC2.2 (**Figure 27**). Dans ces complexes, l'activité catalytique est apportée par les protéines EZH1/2 qui catalysent l'ajout des marques H3K27me1-3 sur les histones.

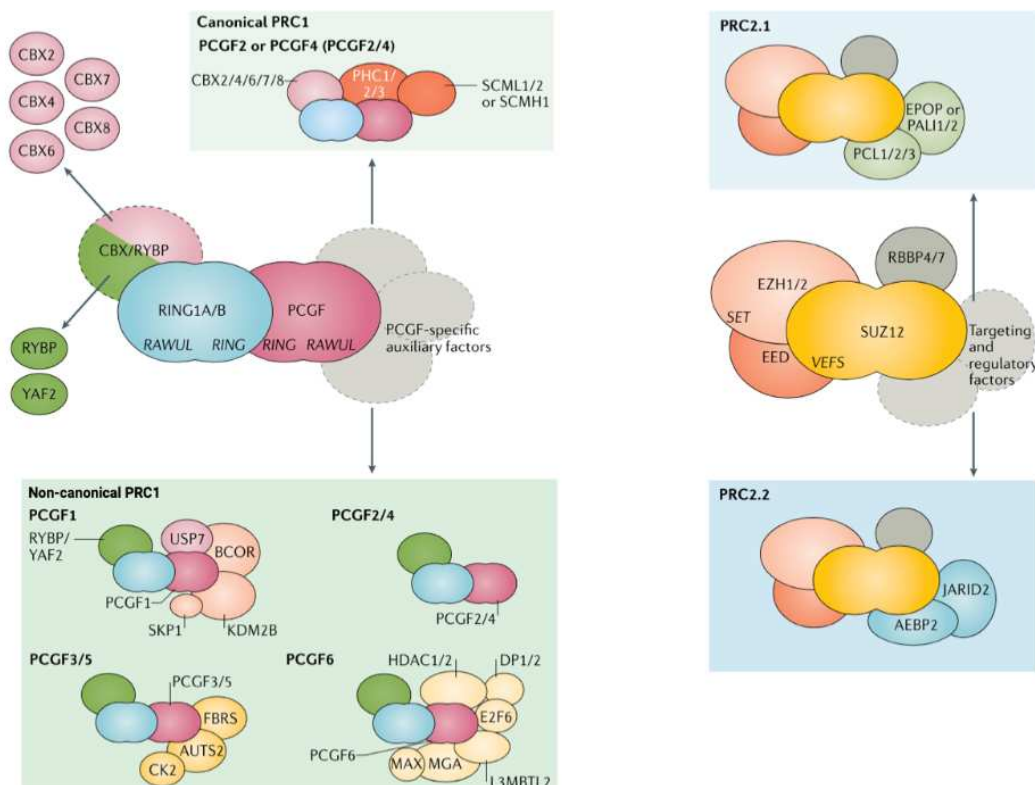


Figure 27 : Composition des complexes PRC chez les mammifères

Figure de Blackledge et Klose (2021) [304]

3.2.1.5.1.2 Le domaine chromatinien polycomb

Comme précédemment mentionné, les PRCs ont pour cible principale des CGIs hypométhylés. Une fois dirigé vers ces régions, ils vont agir ensemble pour former un domaine chromatinien polycomb pouvant atteindre jusqu'à 10kb, riche en H2AK119ub, H3K27me3 et occupé par les PRCs. Une série de mécanismes intriqués et de communication lie les différentes activités polycomb afin de créer et maintenir ces domaines chromatinien particuliers (**Figure 28**).

Parmi ces mécanismes, il a été montré que la marque H2AK119ub déposée par cPRC1 est reconnue par les sous-unités RING1 et RING1 and YY1 Binding Protein / YY1 Associated Factor 2 des ncPRC1 qui vont alors amplifier et diffuser l'ubiquitination H2AK119 ainsi que la fixation des ncPRC1.

Du côté de PRC2, un mécanisme d'amplification similaire est également présent avec la marque H3K27me3 initialement déposée qui est reconnue par EED des PRC2 et va conduire à une amplification et une diffusion de la méthylation de l'histone H3.

La marque H2AK119ub va également être reconnue par les sous-unités Jumonji and AT-Rich Intercation Domain Containing 2 et AE Binding Protein 2 de PRC2.2 qui vont alors s'accumuler à cet endroit. Cela entraîne l'apparition des marques H3K27me3. De la même façon, H3K27me3 est également reconnue par les sous-unités CBX de cPRC1. Malgré une activité catalytique plus faible que celle des ncPRC1, le recrutement de cPRC1 aboutit au dépôt des marques H2AK119ub dans certains contextes.

Ainsi les marques de chacun des PRCs permettent le recrutement du complexe capable de déposer la marque complémentaire. Cela aboutit à la mise en place de ce qui a été décrit comme les domaines chromatinien polycomb caractérisés par une abondance des marques H3K27me3, H2AK119ub1 et des complexes PRCs.

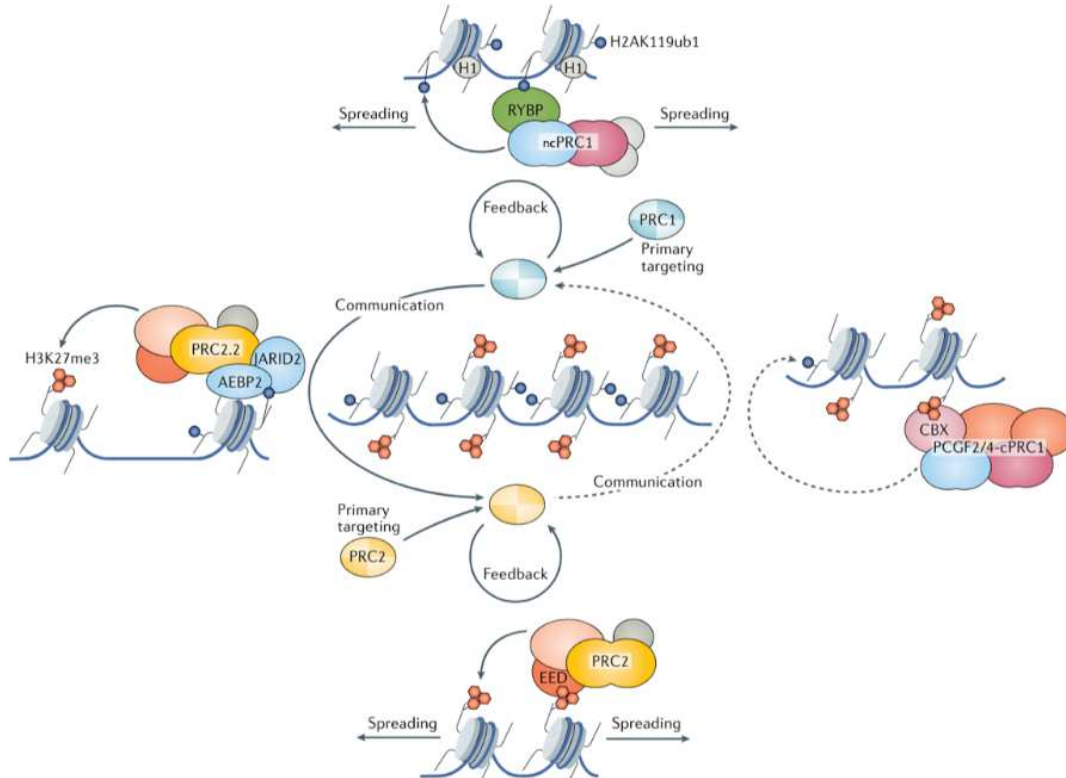


Figure 28 : Formation et diffusion des domaines chromatinien polycomb

Figure de Blackledge et Klose (2021) [304]

3.2.1.5.2 La régulation génique médiée par les PRC

3.2.1.5.2.1 Une répression de la transcription...

Malgré des activités intégrées de PRC1 et PRC2 au sein des domaines chromatiniens polycomb, il semble que leurs activités pour empêcher la transcription génique soient indépendantes.

Si la répression via PRC1 implique une répression de la transcription par des « readers » de la marque H2AK119ub ou par un effet direct de l'ubiquitination sur le processus de transcription, la répression via PRC2 passe par des « readers » de la marque H3K27me3 ou par la méthylation de protéines non-histones impliquées dans la transcription (**Figure 29**). En revanche, une synergie entre ces activités a été observée ce qui fournit une barrière robuste à l'activation inappropriée des gènes.

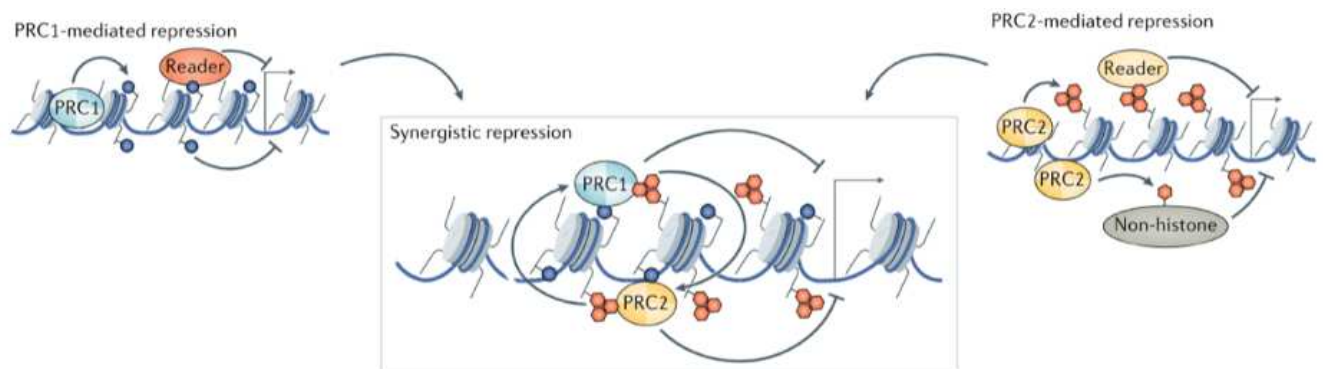


Figure 29 : Répression de l'expression génique par les PRC [304]

Figure de Blackledge et Klose (2021) [304]

3.2.1.5.2.2 ... mais aussi une potentialisation de son activation.

De récentes recherches ont remis en cause le concept selon lequel les PcG jouent uniquement un rôle de répression de la transcription. En effet, il semble que les PRCs soient également capable de potentialiser l'expression d'un gène en recrutant différents acteurs tel que des HDACs ou en permettant des interactions entre différents éléments de la chromatine tels que des enhancers et des promoteurs [304]. Dans le contexte des SS, il est important de noter que cette activité de potentialisation de l'activation génique a été décrite pour le ncPRC1.1 sur lequel nous reviendrons par la suite [305].

3.2.1.6 Les protéines tritorax

Le groupe des protéines tritorax est tout aussi complexe que celui des protéines PcG [303] et se compose de 4 familles : *Imitation Switch*, Chromodomain helicase DNA-binding, *SWItch/Sucrose Non-Fermentable* (SWI/SNF) et Inositol-requiring mutant 80. Nous nous intéresserons au complexe SWI/SNF.

Les complexes SWI/SNF ont initialement été décrits dans les levures avant d'être identifiés chez les mammifères et sont répartis en différents sous-types dont le nombre a récemment été porté à trois : *Canonical BRM or BRG Associated Factor* (CBAF), *non-canonical*

BAF (ncBAF) et Polybromo-Associated BAF (PBAF) [306] (**Figure 30**). Chez les mammifères, ces groupes protéiques sont très complexes et sont tous constitués d'une protéine porteuse de l'activité ATPase (*Brahma humain* (BRM) aussi connue sous le nom de *SWI/SNF related, matrix associated, actin-dependant regulator of chromatin, subfamily A, member 2* (SMARCA2)) ou *Brahma Related Gene 1* (BRG1) aussi nommée SMARCA4), auxquelles est associée jusqu'à quinze autres protéines.

On note que seuls les complexes CBAF et ncBAF contiennent la sous-unité SS18 impliquée dans la fusion SS18-SSX. De même, la sous-unité SMARCB1, sur laquelle nous reviendrons dans le cadre des mécanismes oncogéniques médiés par la fusion (cf. **3.6.2.1**), n'est retrouvée que dans les complexes CBAF et PBAF. Dans la suite de ce manuscrit l'utilisation du terme « BAF » fera référence à l'ensemble des sous-types BAF.

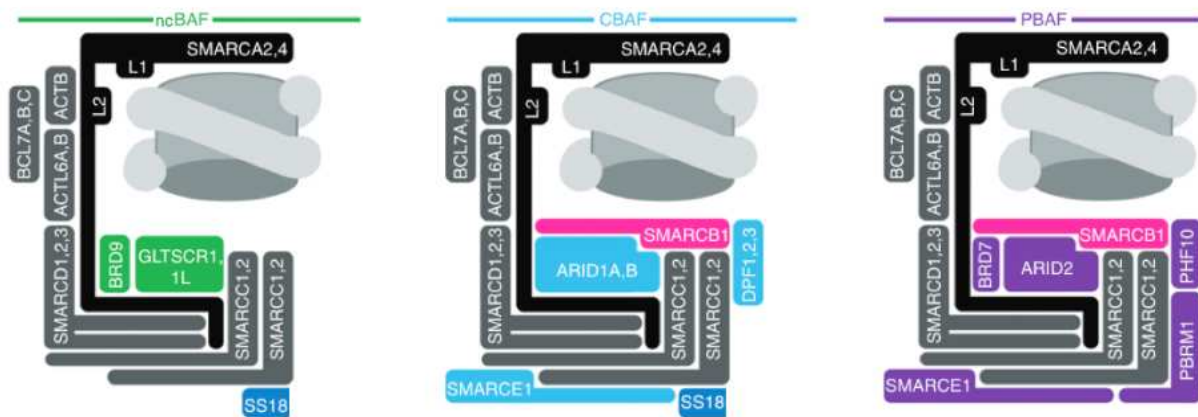


Figure 30 : Composition des complexes BAF

D'après Li et al. (2021) [307]

On note, la présence dans tous les complexes la présence de SMARCA2 (BRM) ou SMARCA4 (BRG1), en noir (SMARCA2,4). Seuls les complexes ncBAF et CBAF contiennent SS18 (en bleu foncé)

Ces complexes utilisent l'énergie fournie par l'hydrolyse de l'ATP au niveau de leurs sous-unités catalytiques SMARCA2/4 pour faire glisser ou pour retirer les nucléosomes et ainsi remodeler la chromatine [308]. Les rôles des sous-unités non-catalytiques quant à elles ne sont pas encore bien compris.

Pour faciliter et maintenir l'accessibilité de l'ADN, les complexes BAF sont capables de se fixer à une multitude de loci (incluant des « enhancers » distaux et des promoteurs). Ainsi, dans des cellules souches embryonnaires de souris, on trouve environ 300 000 complexes par cellule qui se fixent sur 20 000 à 40 000 domaines de la chromatine relativement larges car pouvant atteindre les 2 à 4kb [309].

Tout comme pour les PRCs, des travaux ont mis en avant une activité opposée à celle qui lui a initialement été décrite. Il semblerait que les complexes BAF peuvent également positionner les nucléosomes de façon à ce que des facteurs de répression de la transcription puissent se fixer ou encore pour établir un état de la chromatine non compatible avec la transcription génique comme cela a pu être montré dans des recherches sur le Virus d'Immunodéficience Humaine (VIH) [310].

3.2.1.7 Dynamique de l'opposition des complexes BAF (Trx) et PRC (PcG)

Comme nous venons de le décrire, les complexes BAF et PRC ont des fonctions principales opposées, respectivement d'activation et de répression de la transcription génique respectivement. La dynamique de l'opposition des fonctions entre ces complexes a été en partie élucidée par Kadoch *et al.* en 2017 [311]. Ils ont montré que le mécanisme par lequel BAF s'oppose aux PRC passe par une éviction de ces derniers via l'action de sa sous-unité ATPase. Cette éviction est rapide et se déroule dans les 2 à 5 minutes suivant le recrutement de BAF. A la suite de cette éviction, une perte de la marque H2AK119ub est constatée moins de 10 minutes après le recrutement de BAF. Enfin, une fois les marques H2AK119ub complètement disparues, c'est au tour des marques H3K27me3 de disparaître. Cette disparition sera complète au bout de 20 minutes. Quarante minutes après la fixation de BAF 90% de la chromatine ciblée est accessible (**Figure 31**).

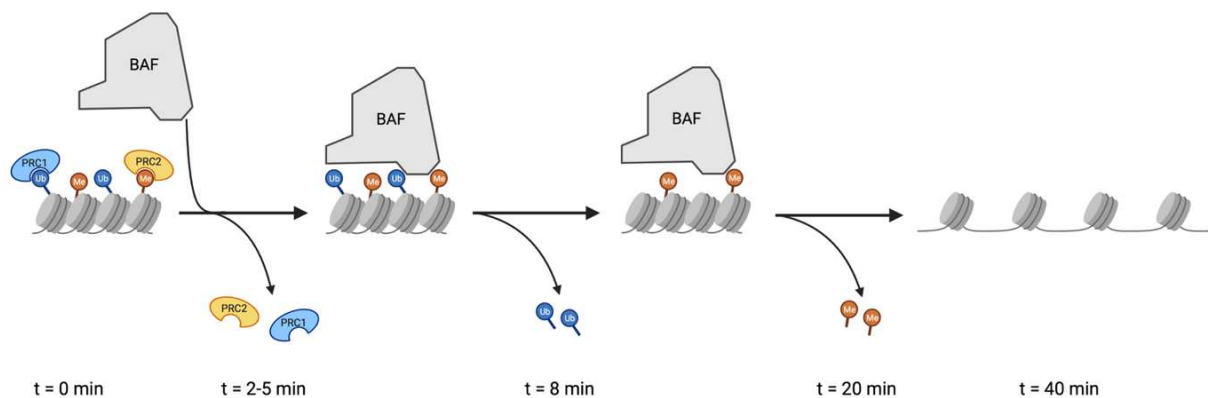


Figure 31 : Cinétique de l'opposition des complexes BAF et PRC

D'après Kadoch *et al.* (2017) [311]

Les marques H2AK119ub sont présentées en bleu et les H3K27me3 en rouge.

Dans la littérature, les mutations des sous-unités de BAF sont régulièrement associées à une altération des domaines chromatinien reconnus par les complexes polycomb dans l'ensemble du génome, confirmant ainsi la relation entre ces complexes BAF et PRC. Cependant, il reste des points à élucider notamment concernant la façon dont PRC1 et PRC2 sont évincés. En effet, il n'est pas encore clair si cela se fait de façon directe ou indirecte ni si cela nécessite les mécanismes de réplication ou de transcription par exemple.

Après le rappel de ces quelques notions d'épigénétique, nous allons maintenant revenir aux SS et à la protéine de fusion SS18-SSX, qui contient la sous unité BAF SS18.

Bien qu'une protéine de fusion présente des propriétés qui lui sont propres, notamment des propriétés oncogéniques, les propriétés physiologiques de chacun de ses constituants permettent généralement d'expliquer au moins en partie ses fonctions. Dans la suite de ce paragraphe, nous verrons donc plus en détails les structures et rôles des constituants de la fusion SS18 et SSX avant de nous intéresser à ceux de leur forme fusionnée.

3.3 SS18

SS18 est une protéine de 54kDa composée de 387 acides aminés (a.a) et exprimée de façon ubiquitaire dans les tissus sains depuis l'embryogenèse jusqu'à l'âge adulte [312], [313]. Son nom dérive de la translocation présente dans les SS et est l'abréviation de « Synovial Sarcoma 18 ». En dehors de sa fusion avec SSX, la fonction de SS18 est toujours en cours d'investigation. Cependant, les données bibliographiques décrivent SS18 comme impliquée dans la modification de la chromatine et la régulation des gènes, elle fait en effet partie du complexe Trx BAF (cf 3.2.1.6).

3.3.1 Structure de SS18

La version sauvage de la protéine SS18 est une protéine composée de deux régions possédant des fonctions différentes (**Figure 32**).

La première région est le domaine *N-terminal Homologue à SS18* (SNH), ce domaine est conservé au sein de plusieurs espèces. Il contient la séquence *Nuclear Localization Signal* (NLS) bien que cette dernière ne présente pas de séquence consensus pour un tel rôle [314].

La seconde région est localisée à l'extrémité C-terminale et fait environ 200 a.a. Riche en glutamine (Q), proline (P), glycine (G) et tyrosine (Y), elle a alors été nommée QPGY. Malgré la répétition de ces a.a, aucun motif consensus n'a pu être identifié dans cette région. Il est à noter qu'une isoforme de SS18 contenant 31 a.a supplémentaires dans la région QPGY a également été décrite [315].

Grâce à ces différentes régions, des interactions avec diverses protéines va être possibles permettant ainsi des rôles variés.

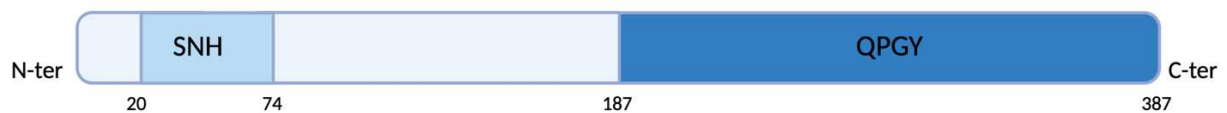


Figure 32 : Schéma de la structure de SS18

Les différentes régions particulières, SNH et QPGY, de la protéine sont représentées dans différentes nuances de bleu. Les chiffres indiquent le numéro des acides-aminoés.

Compte tenu du fait que différentes études ont montrées que les translocations affectent souvent des facteurs de transcription et que des domaines similaires à QPGY sont souvent retrouvés dans des activateurs de la transcription [316], [317], il a été initialement supposé que SS18 était un facteur de transcription. Cependant, Clark *et al.* ont mis en avant une absence de motifs de liaison à l'ADN dans SS18 réfutant l'hypothèse que cette protéine était un facteur de transcription [313]. En revanche, Brett *et al.* ont montré que SS18 possède des propriétés de modulation de la transcription [316]. Diverses études ont permis de mettre en lumière différentes interactions protéiques avec SS18 expliquant ce rôle de modulateur de la transcription qui pourrait être indirect. Les différentes interactions de SS18 sont schématisées dans **Figure 33**.

3.3.2 Activation de la transcription

L'activation de la transcription par SS18 est majoritairement expliquée dans la littérature par son rôle en tant que membre des complexes BAF. En effet, Thaete *et al.* ont montré une co-localisation de SS18 avec la protéine SMARCA2 des complexes BAF [318]. Par la suite, elle a été décrite comme étant intégrée dans les sous-types ncBAF et CBAF au sein desquels elle interagit avec les sous-unités catalytiques SMARCA2/4 [306], [319], [320]. Cette interaction se fait entre les a.a 15 à 75 de SS18 qui interagissent avec les a.a 155 à 210 (environ) de SMARCA2/4 [321].

SS18 pourrait également interagir de façon indirecte avec une autre sous-unité de BAF : SMARCB1. Cette interaction se ferait via la protéine *Acute lymphoblastic leukemia Fused gene from chromosome 10* (AF10) qui est un facteur de transcription et *Glioma Amplified Sequence 41* (GAS41) [322], [323]. Aux vues de la récente caractérisation des différents sous-types de BAF, cette interaction n'est possible que dans les complexes CBAF.

SS18 n'interagit pas seulement avec des composants des complexes BAF. Ainsi, AF10 sus-présentée a également la capacité d'interagir avec l'Histone MéthylTransferase (HMT) *Disruptor Of Telomeric silencing 1-L* (DOT1L) dont un rôle d'ajout de marques histones H3K79me1-3 est associée à une activation de gènes du développement dans la leucémogénèse [324].

Une interaction directe entre SS18 et une autre protéine de modification des histones a également été décrite. Il s'agit de l'HAT p300 qui catalyse l'ajout d'acétylation sur les protéines histones, participant ainsi à la relaxation de la chromatine et donc à la transcription des gènes [325]. Cette interaction ne peut se faire qu'en présence d'une séquence spécifique de 43 a.a contenue dans le domaine SNH de SS18 [326].

Dans les années 2000, Perani *et al.* ont également démontré une interaction entre SS18 et *SS18-Interacting Protein/Co-Activator Activator protein* (SIP/CoAA), un co-activateur de la transcription médiée par les hormones [327].

Le rôle de ces différentes interactions est peu décrit. Cependant, il semblerait que SS18 soit impliqué dans le recrutement du complexe BAF sur la chromatine. Le recrutement de BAF par p300 a déjà été décrit, il serait intéressant de savoir si ce recrutement est médié par l'interaction p300/SS18 [328]. De même, le rôle de co-activation de SIP/CoAA avec SS18 n'est possible que dans le cas de complexes BAF fonctionnels et notamment du maintien de l'interaction SS18/SMARCA2/4 suggérant de nouveau un rôle de SS18 dans le recrutement de BAF [327].

Enfin, Perani *et al.* ont présenté des résultats montrant que le domaine QPGY serait impliqué dans l'amélioration de l'interaction entre SS18 et SMARCA2. En étudiant l'interaction entre QPGY/SMARCA2, l'équipe a montré que QPGY n'interagit pas avec cette sous-unité. En revanche, QPGY serait plutôt impliqué dans l'oligomérisation de la protéine SS18 [321]. Cette oligomérisation potentialise l'activation de la transcription qui est jusqu'à 145 fois supérieur à celle obtenue en son absence. L'oligomérisation de SS18 semble donc nécessaire pour avoir une transcription efficace, cependant, aucune étude n'a investigué la potentielle oligomérisation de SS18 au sein de BAF.

Cette oligomérisation a récemment été décrite pour permettre un processus de séparation de phase, un principe émergent permettant d'expliquer les régulations spatio-temporelles précises qui ont lieu au sein des cellules, lui-même essentiel pour le recrutement de SMARCA4 par la suite [329], [330].

3.3.3 Répression de la transcription

Mammalian Switch-independent 3A (mSin3A) est un composant du complexe HDAC, qui possède une activité de répression de la transcription, et son interaction avec SS18 a été rapportée au début des années 2000. Elle nécessite les a.a 1 à 93 ainsi que 187 à 379 de SS18 tandis que les 8 a.a en C-terminal semble au contraire réguler négativement cette interaction [331]. Les auteurs ont donc montré une régulation de l'activité transcriptionnelle de SS18 par les HDAC contenant mSin3A.

L'activité de répression de la transcription associée à SS18 est donc plus rare, ou en tout cas beaucoup moins décrite dans la littérature, mais reste possible.

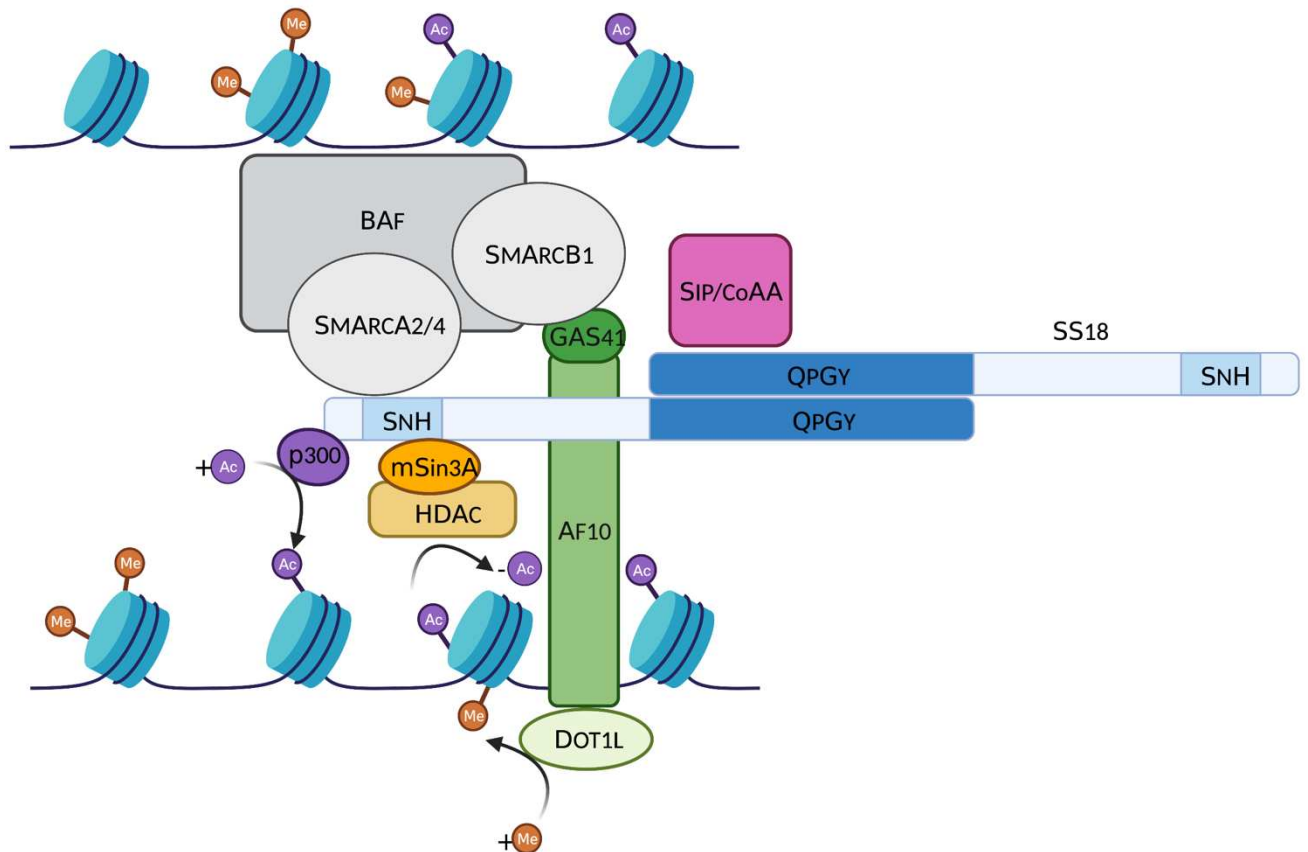


Figure 33 : Schéma des Interactions protéiques avec SS18.

SS18 interagit via son domaine SNH avec les protéines SMARCA2/4 des complexes ncBAF et CBAF. Au sein de CBAF, elle interagit également de façon indirecte via AF10 et GAS41 avec la sous-unité SMARCB1. Une interaction avec l'HAT p300 et l'HMT DOT1L, de façon directe et indirecte respectivement, a également été décrite ainsi que celle avec SIP/CoAA. Elle est également capable de s'oligomériser. L'ensemble de ces interactions sont associées avec une activation de la transcription. Une activité de répression de la transcription a également été décrite via son interaction avec mSin3A.

Les rôles de SS18 sont donc multiples et nécessitent encore des recherches pour être bien compris. Plutôt associée à une activation de la transcription, en cohérence avec sa qualité de membre des complexes BAF, le rôle de SS18 semble tout de même plus compliqué que cela comme en témoigne sa capacité à interagir également avec des acteurs impliqués dans la répression de la transcription comme mSin3A.

3.4 SSX

La famille des protéines *Synovial Sarcoma X breakpoint* (SSX) se divise en 9 membres et se compose de 188 a.a, à l'exception de SSX8 qui n'en compte que 142. Contrairement à SS18, l'expression des protéines SSX est relativement limitée au sein des tissus adultes où on ne les retrouve que dans les testicules et, à très faible niveau, dans la thyroïde [332]. Au cours du développement, l'expression de SSX est également retrouvée au sein des cellules souches mésenchymateuses et est perdue lors de la différenciation de ces cellules [333]. En revanche, ces protéines sont retrouvées exprimées dans plusieurs cancers comme les mélanomes, les lymphomes, les cancers du sein et ovariens entre autres [334].

3.4.1 Structure de SSX

Trois domaines fonctionnels majeurs ont été identifiés au sein de ces protéines : le domaine *KRüppel-Associated Box* (KRAB), *SSX Divergent Domain* (SSXDD) et *SSX Repression Domain* (SSXRD) (**Figure 34**).

Les domaines KRAB ont été identifiés dans les années 1990 comme étant impliqués dans la répression de la transcription, notamment dans un sous-groupe de protéines présentant des motifs en doigt de zinc capables de se fixer à l'ADN [335], [336].

Le domaine SSXDD est la région des protéines au sein de laquelle l'hétérogénéité entre les différents membres de la famille SSX est la plus importante. Bien qu'aucun rôle particulier ne lui ait encore été attribué à ce jour, Dos Santos, Bruijn et van Kessel ont cependant supposé qu'il joue un rôle important pour le potentiel oncogénique au sein de la protéine de fusion SS18-SSX [337].

Enfin, le domaine SSXRD correspond aux 33 a.a localisés à l'extrémité C-terminale de la protéine. Cette région est conservée à 95% entre les membres SSX1-5 [338]. Elle est également porteuse du signal de localisation nucléaire NLS des protéines SSX, comme décrit par Dos Santos et son équipe grâce à des expériences de substitutions d'a.a [314]. Récemment, il a été rapporté que la structure de ce domaine ressemble à un domaine de fixation de l'ADN très commun chez les eucaryotes : un domaine en doigt de zinc C2H2 (Cystéine 2 Histidine 2). Cependant, des recherches complémentaires sont nécessaires afin de valider si les capacités de fixation à l'ADN décrites chez SSX2 sont portées par le domaine KRAB, par SSXRD ou bien par ces deux domaines simultanément [339], [340]. Le domaine SSXRD a également été décrit comme étant essentiel pour les interactions de SSX avec les PcG [340].

Diverses fonctions et interactions protéiques ont par la suite été associées à ces différents domaines. Il est à noter que la majorité des recherches sur les protéines SSX se font dans le contexte du SS. Ce sont donc principalement les protéines SSX1 et SSX2 qui sont décrites dans la littérature créant ainsi un manque d'informations quant au fait que ces résultats soient transposables aux autres protéines SSX.

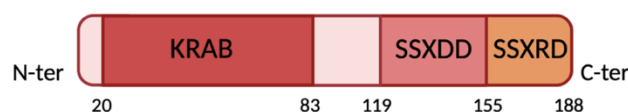


Figure 34 : Schéma de la structure des protéines SSX.

Les différentes régions particulières de SSX sont représentées en différentes nuances de rouge. Les chiffres indiquent le numéro des acides-aminés.

3.4.2 Fonctions de SSX

Tout comme pour SS18, les différentes régions qui composent SSX permettent diverses interactions avec d'autres protéines permettant à SSX de jouer une multitude de rôles au sein des cellules (

Figure 35).

3.4.2.1 Répression de la transcription

Une fonction de répression de la transcription a été associée *in vitro* aux domaines KRAB et SSXRD via des expériences avec des gènes rapporteurs [316], [338]. Contrairement à ce qui était attendu, il s'avère que la région SSXRD possède une activité de répression de la transcription supérieure à celle de KRAB, cette dernière étant relativement faible dans SSX en comparaison aux domaines KRAB d'autres protéines.

3.4.2.2 Activation de la transcription

De multiples liens entre les protéines SSX et les protéines PcG ont été décrits dans la littérature. Au sein des cellules cancéreuses, une colocalisation avec les composants PCGF4 et RING1 des complexes PRC1 ainsi qu'avec EZH2 des PRC2 a été décrite [314], [339]–[341]. Cependant, le profil de fixation de SSX sur l'ADN reste encore à établir et les interactions moléculaires entre SSX et les PcG restent controversées. Bien qu'il y ait une association claire entre SSX et les PcG, la manière par laquelle SSX est recrutée au niveau des domaines chromatiniens occupés par polycomb n'est toujours pas élucidée. Par exemple, il a été montré par des filtrations sur gel et des expériences sur extractions de noyaux que SSX et PRCs ne sont pas dans les mêmes fractions [339]. En revanche il a également été montré que SSX seule précipite avec la sous-unité KDM2B du complexe ncPRC1.1 [296].

Dans les cellules cancéreuses, les PcGs se trouvent au sein d'agrégats nucléaires relativement larges, beaucoup plus imposants que ceux visibles dans les cellules saines, appelés corps PcGs [342]. Une équipe danoise a démontré que, dans des cellules cancéreuses, l'expression ectopique de SSX2 entraîne la disparition des corps PcGs [339]. Cette disparition des PcG, attribuée à SSX2, est associée à une surexpression de gènes connus comme étant réprimés par les PRCs. Cette fonction nécessite la région SSXRD qui permet l'interaction avec les corps PcGs et KRAB menant à leur déstabilisation.

Au niveau du domaine SSXRD, une interaction avec *LIM homeobox protein 4* (LHX4) a été montrée *in vivo* [343]. LHX4 montre des motifs typiques des facteurs de transcription et est associée à une activation de la transcription de ses gènes cibles. Il a été décrit dans le contexte des leucémies chroniques et aiguës où sa surexpression inhibe l'apoptose [343], [344]. Un éventuel rôle dans les SS n'a pas fait l'objet de travaux publiés à ce jour.

Des interactions au niveau du domaine KRAB des protéines SSX ont également été décrites dans la littérature. Ces interactions concernent les protéines *Ras-like GTPase interactor* (RAB3IP) impliquée dans le transport des vésicules et *Synovial Sarcoma X breakpoint 2 Interacting Protein* (SSX2IP) impliquée dans la régulation du cycle circadien. Ces interactions ne seront pas plus décrites dans ce manuscrit puisque le domaine KRAB n'est pas retrouvé dans la fusion SS18-SSX qui nous intéresse par la suite.

De façon plus globale, les protéines SSX ont également été identifiées comme jouant un rôle clé dans la migration cellulaire [333]. Par analogie, il est supposé qu'elles puissent jouer un rôle dans la diffusion métastatique.

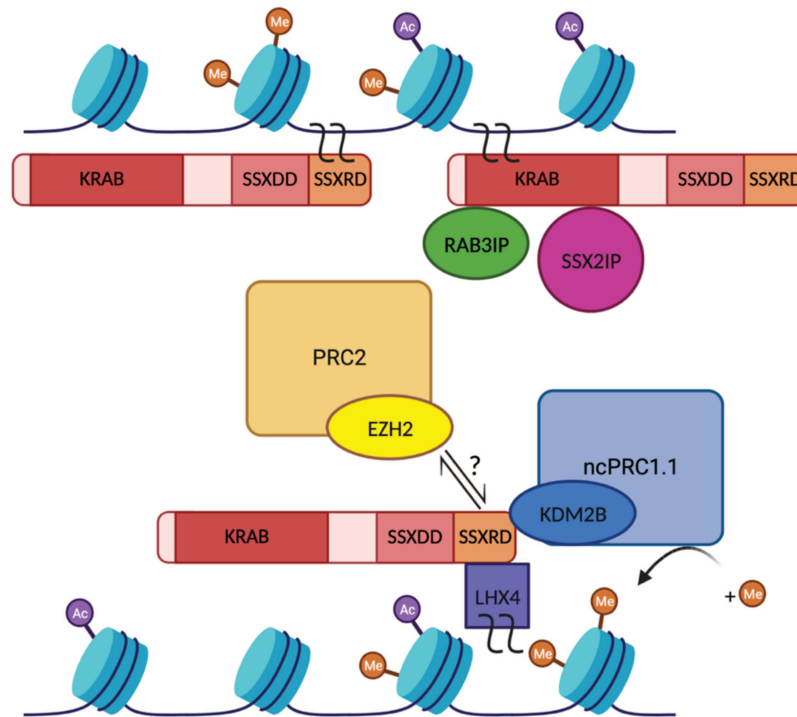


Figure 35 : Schéma des interactions protéiques avec SSX.

SSX est capable de se fixer à l'ADN via son domaine KRAB, ce dernier ne porte cependant pas une forte activité de répression de la transcription. Ce domaine permet également l'interaction avec les protéines RAB3IP et SSX2IP impliquées dans la régulation du cycle circadien. Une fixation de l'ADN de façon indirecte via LHX4 est également proposée dans la littérature. Une relation entre SSX et les complexes PRC a été décrite. Si SSX interagit via son domaine SSXRD avec KDM2B du complexe ncPRC1.1 aucune interaction directe avec les PRC2 n'a pu être décrite bien que ces protéines colocalise dans les cellules.

3.5 SS18-SSX

SS18-SSX est la protéine pathognomonique des SS et est issue de la translocation $t(X;18)(p11.2;q11.2)$ entre les chromosomes X et 18 (**Figure 36**). Cette translocation n'est présente que sur un seul bras des chromosomes, il reste donc un allèle sauvage pour chacune des protéines SS18 et SSX au sein des cellules transformées.

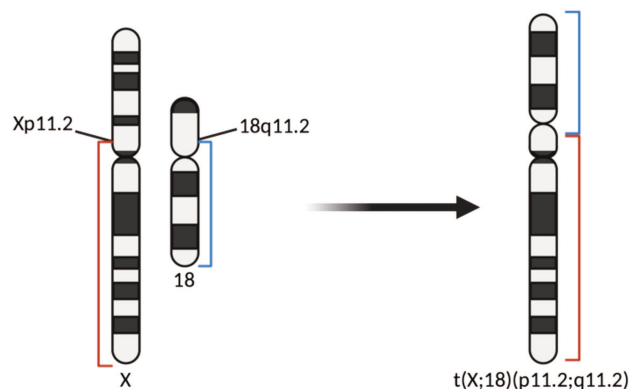


Figure 36 : Schéma de la translocation t(X;18)(p11.2;q11.2).

La partie en rouge représenté la partie du chromosome X qui va fusionner avec la partie du chromosome 18 (en bleue) pour former la translocation t(X;18)(p11.2;q11.2)

Le mécanisme à l'origine de la translocation n'est pas encore élucidé, mais implique la présence de séquences consensus pour des clivages par la topoisomérase III, notamment dans l'intron 10 du gène de SS18 [345]. En effet, ces séquences sont retrouvées dans plus de 80% des cas à proximité du point de rupture de SS18. De plus, il est à noter que la translocation ne se fait pas par une simple apposition des deux extrémités des gènes mais qu'elle entraîne toujours la délétion d'un fragment allant de 13 à 172 pb.

Comme déjà évoqué, la translocation t(X ;18) aboutit à la traduction d'une protéine de fusion SS18-SSX jouant un rôle majeur dans le développement et la progression des SS (**Figure 37**).

De façon plus précise, la protéine de fusion correspond à la protéine SS18 dans laquelle les 8 derniers a.a ont été remplacés par les a.a 110 à 188 d'une protéine SSX. Ainsi, on retrouve dans la fusion le domaine SNH et la quasi-totalité du domaine QPGY de SS18 ainsi que les régions SSXDD et SSXRD des protéines SSX. La protéine de fusion possède donc deux NLS.

Parmi les 9 protéines SSX, seules SSX1, SSX2 et SSX4 ont été retrouvées dans des fusions avec SS18 [346]–[348]. La translocation SS18-SSX1 est retrouvée dans environ 2/3 des tumeurs tandis que le variant SS18-SSX2 se retrouve dans le 1/3 restant [227], [230]. La translocation SS18-SSX4 est très rare. Différentes isoformes pour chacun de ces réarrangements ont été décrits, la plupart causés par des insertions d'exons [349].

Pourquoi la fusion ne se fait uniquement avec certains membres des protéines SSX reste encore en cours d'investigation. Il semble cependant que la composition en a.a à des



positions stratégiques de la molécule, permettant alors une configuration et/ou des interactions spécifiques, soient à l'origine de cette spécificité [350].

Figure 37 : Schéma de la structure de la protéine de fusion SS18-SSX.

Les différentes régions particulières de SS18-SSX sont représentées avec, en nuance de bleu, les parties associées à SS18 et, en nuance de rouge, les parties associées à SSX. Les chiffres indiquent le numéro des acides-aminés (en haut par rapport à la protéine SS18 sauvage et en bas par rapport à la protéine SSX sauvage).

La fusion de SS18-SSX est décrite comme étant l'élément « driver » de la maladie et plusieurs observations soutiennent cette hypothèse.

Tout d'abord, dans 1/3 des cas de SS, la présence de la protéine de fusion est la seule anomalie génétique retrouvée au sein des cellules cancéreuses [351]. En effet, la charge mutationnelle de ces tumeurs est relativement faible, notamment dans les formes pédiatriques de ces cancers [352]–[354]. L'élévation de cette charge mutationnelle est associée à des métastases dans lesquelles on retrouve d'ailleurs la présence de la fusion, soutenant ainsi l'hypothèse du rôle charnière de la translocation dans la maladie [351], [355].

Enfin, différentes équipes montrent que la fusion est à la fois nécessaire et suffisante à l'initiation du processus tumoral et à la progression des tumeurs [356], [357]. En effet, Haldar *et al.* ont montré dans un modèle murin que l'expression conditionnelle de SS18-SSX dans les cellules exprimant le facteur de régulation myogénique Myf5 via un système Cre-Lox, induit

le développement de tumeurs chez la souris. La pénétrance de ces tumeurs est de 100% et ces dernières récapitulent à l'identique les tumeurs humaines de SS au niveau histologique, immunitaire et de l'expression génique [357]. Le rôle de SS18-SSX a également été montré *in vitro* où des extinctions de son expression dans différentes lignées cellulaires entraînent alors un arrêt de prolifération et la mort des cellules par apoptose [358]–[360].

Cette transformation oncogénique passe par l'activation mais également la répression de l'expression de nombreux gènes principalement impliqués dans les programmes de développement [361]. Cependant, la fixation de SS18-SSX à certains loci n'est pas associée à des changements dans l'expression génique, suggérant alors d'autres rôles encore inconnus de la protéine de fusion.

3.6 Mécanismes impliqués dans la transformation oncogénique par SS18-SSX

Malgré plusieurs années de recherche, les mécanismes oncogéniques induits par SS18-SSX n'ont pas encore été complètement élucidés et de nombreuses zones d'ombre subsistent.

3.6.1 Interactions protéiques de SS18 et SSX

3.6.1.1 On prend les mêmes et on recommence...

A l'issue de la fusion, la plupart des interactions protéiques propres à SS18 et à SSX ont été conservées. Ainsi, SS18-SSX, grâce à sa partie SS18, s'intègre au sein des complexes CBAF et PBAF et ses interactions avec les protéines p300, AF10 (et avec SMARCB1 et DOT1L qui y sont associées) et SIP/CoAA sont conservées [322], [326], [327]. En revanche, l'interaction avec mSin3A est réduite, bien que toujours présente, tandis que les capacités d'oligomérisation semblent perdues [321], [331].

Du côté de la partie SSX, la transcription évaluée à l'aide de gènes rapporteurs montrent une transcription plus active avec SS18-SSX qu'avec SSX seule. Cependant le niveau d'activation de la transcription de SS18-SSX est plus faible qu'avec SS18 seule [316]. La colocalisation avec les protéines PcG et l'interaction avec KDM2B sont quant à elles toujours présentes [296], [341]. L'interaction de la fusion avec LHX4 n'a pas été étudiée mais on peut supposer qu'elle est toujours possible, la région SSXRD étant intacte dans la protéine de fusion. Enfin, la perte de la région KRAB entraîne la perte des interactions avec RAB3IP et SSX2IP comme déjà mentionnée. Compte tenu de la nécessité de KRAB pour la déstabilisation des corps PcGs dans les cellules cancéreuses, il est probable que SS18-SSX ne puisse plus assumer cette fonction.

3.6.1.2 ... mais pas seulement !

Des interactions spécifiques à la protéine de fusion ont également été décrites, notamment avec les répresseurs de la transcription d'E-cadhérine, Snail et Slug, mais également avec les protéines modulatrices de la transcription *Activating Transcription Factor 2* (ATF2) et TLE1 [362], [363].

3.6.1.2.1 Snail, Slug et la régulation d'E-cadhérine

E-cadhérine est une protéine dont le rôle est déterminant pour l'apparition d'un phénotype épithélial. SS18-SSX étant retrouvée dans la composante épithéliale des SS biphasiques, Saito *et al.* ont voulu étudier l'impact de SS18-SSX sur/avec la E-cadhérine. Ils ont montré que SS18-SSX1 se lie fortement au répresseur Snail tandis que Slug peut lier SS18-SSX2 avec une très forte affinité et SS18-SSX1 avec une affinité un peu plus faible [362].

Ces travaux sont une piste pour expliquer la prédominance de SS18-SSX1 plutôt que SS18-SSX2 de SS18-SSX1 avec une histologie biphasique et celle de SS18-SSX2 avec l'histologie monophasique. En effet, l'interaction de Snail et Slug avec les protéines de fusion inhiberait leur fixation sur le promoteur d'E-cadhérine. Snail ayant été décrit comment étant un répresseur d'E-cadhérine plus efficace que Slug, il est cohérent d'observer une plus forte expression d'E-cadhérine en son absence qu'en l'absence de Slug. Cette régulation d'E-cadhérine par les protéines SS18-SSX est schématisée dans la **Figure 38** ci-dessous.

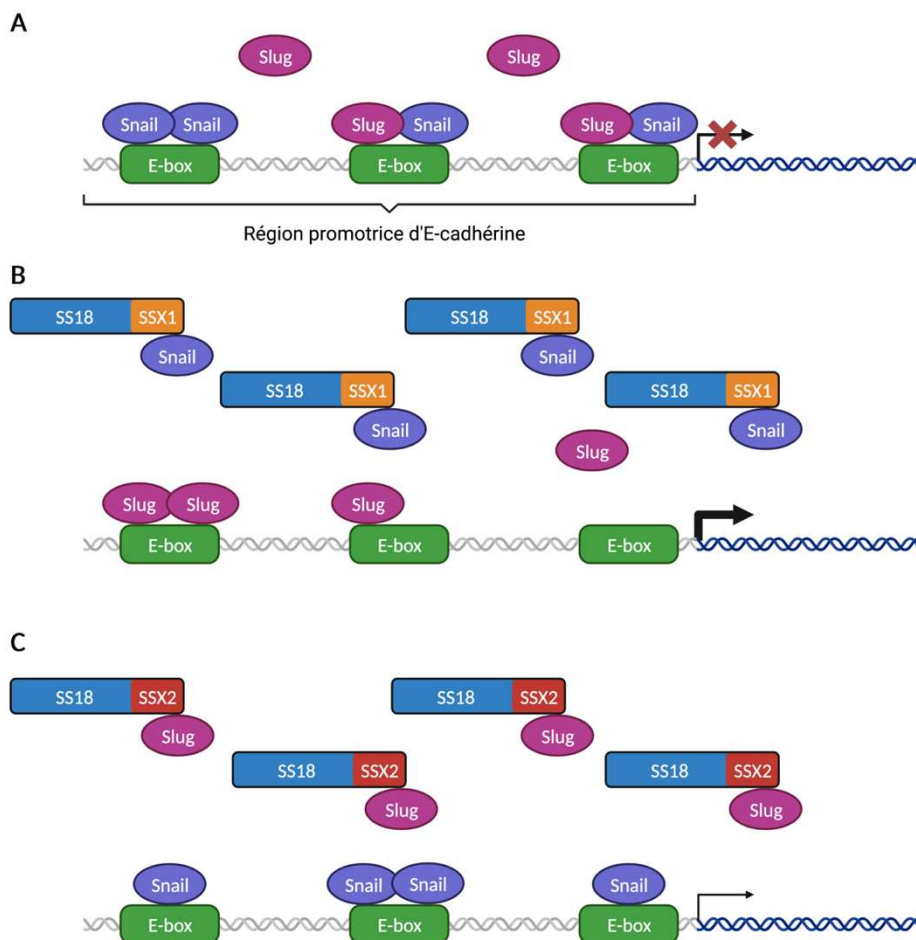


Figure 38 : Probable régulation de l'expression d'E-cadhérine par les protéines SS18-SSX

D'après Saito *et al.* [362]

A. Dans des cellules mésenchymateuses **B.** Dans une cellule de SS exprimant SS18-SSX1 **C.** Dans une cellule de SS exprimant SS18-SSX2.

3.6.1.2.2 ATF2 et TLE1

ATF2 est une protéine de régulation de la transcription reconnaissant des éléments spécifiques du génome sur lesquels elle se fixe et où elle recrutera des HATs associées à une activation de la transcription. En revanche, TLE1 interagit avec des co-activateurs de la transcription sur lesquels il agit de façon dominante pour inhiber la transcription.

Su *et al.* ont montré que SS18-SSX sert de protéine échafaudage entre ces deux protéines, la partie SNH se liant à ATF2 et la partie SSXRD à TLE1 [363]. Le trio protéique composé d'ATF2/SS18-SSX/TLE1 est capable de recruter des complexes de répression de la transcription menant à une inhibition de gènes suppresseurs de tumeurs dans les SS. Les auteurs ont également montré que TLE1 permet la formation d'un groupement de protéines avec des complexes PcGs et des HDACs qui est à l'origine du silencing des gènes cibles de ATF2.

Parmi toutes les interactions présentées ci-dessus, ce sont principalement les effets liés à l'incorporation de SS18-SSX dans les complexes BAF et de colocalisation avec les PRCs qui ont été étudiées. Le paragraphe suivant détaille les mécanismes impliquants la fusion avec les complexes protéiques BAF et PRC au sein des SS actuellement connus.

3.6.2 SS18-SSX, BAF et PRC : une combinaison complexe

3.6.2.1 Altérations des complexes BAF par SS18-SSX

Comme déjà mentionné, la translocation t(X;18)(p11.2;q11.2) ne se fait que sur un seul bras des chromosomes, les formes sauvages de SS18 et SSX peuvent donc techniquement toujours être exprimées. En 2013, Kadoch et Crabtree ont donc cherché, dans un premier temps, à identifier quelle forme de SS18 était principalement incorporée au sein de BAF. Ils ont montré que, au sein des lignées cellulaires de SS, seule une petite portion de BAF est associée à SS18 sauvage puisque la majorité des complexes est associée à SS18-SSX [350]. Compte tenu des fortes conditions dénaturantes nécessaires pour détacher l'une ou l'autre de ces protéines du reste du complexe BAF, l'hypothèse la plus probable est que la compétition entre les deux protéines se fasse au moment de l'incorporation dans les complexes en formation. Il semblerait donc que SS18-SSX prenne le dessus sur SS18 à la suite de son importante expression dans les cellules de SS. En effet, comme déjà montré par Brodin *et al.*, l'expression de la fusion entraîne une diminution de l'expression de la forme sauvage de SS18 [364]. Ainsi, la surexpression de SS18 à un niveau supérieur à celui de SS18-SSX dans des lignées cellulaires permet de restaurer l'association de la forme sauvage à la majorité des complexes BAF [350]. Des résultats identiques sont obtenus dans le cas d'une diminution de l'expression de la fusion à l'aide de siRNAs ou shRNAs.

Kadoch et Crabtree ont ensuite cherché à identifier l'impact de cette modification sur BAF et leur principale découverte concerne la sous-unité SMARCB1. Elle semble être évincée du complexe puis dégradée par le protéasome. Cependant, très récemment, Li *et al.* ont constaté qu'une absence totale de SMARCB1 n'était pas compatible avec l'histologie des SS [307].

En effet, dans des modèles transgéniques murins, une délétion homozygote de SMARCB1 entraîne la survenue de tumeurs histologiquement similaires à des tumeurs rhabdoïdes malignes ou des sarcomes épithélioïdes. Ce type de tumeurs est systématiquement associé à une délétion homozygote de SMARCB1 chez les patients, y

compris en présence de SS18-SSX. En revanche, une meilleure pénétrance est observée quand l'expression de la protéine fusion est combinée à une délétion hétérozygote de SMARCB1. Cette même combinaison est associée au développement de tumeurs dont l'histologie est similaire à celle des SS et avec une meilleure pénétrance que lorsque SS18-SSX seule est exprimée. Il semble donc que SMARCB1 soit toujours présent dans les SS.

Li *et al.* se sont alors intéressés aux différents sous-types de BAF, inconnus lors de la publication des travaux de Kadoch et Crabtree. Ils ont mis en avant que SMARCB1 est tout à fait capable de s'incorporer dans CBAF en présence de la protéine de fusion et que la dégradation de SMARCB1 initialement décrite est en fait le reflet de la dégradation de la quasi-totalité des complexes CBAF par le protéasome [307]. Une analyse de la composition des tumeurs murines montre que CBAF est relativement peu présent (mais non absent) et confirme donc ces résultats. Le mécanisme par lequel cette dégradation a lieu nécessite des recherches complémentaires, mais pourrait être lié à une interaction avec des E3 ubiquitine ligase.

Les auteurs ont cependant remarqué que la quantité de SMARCB1 est réduite de façon moins importante que celle des autres composants spécifiques de CBAF, suggérant un sauvetage de la protéine par un autre complexe. De même, la quantité de sous-unités communes aux différents complexes BAF n'est que peu impactée par la dégradation de CBAF, suggérant une compensation, pas forcément totale, par les autres membres, PBAF et ncBAF.

L'analyse des tumeurs murines a effectivement montré une compensation de la perte de CBAF principalement par PBAF qui est le complexe le plus présent et actif dans les SS. PBAF contient SMARCB1 mais pas SS18-SSX, il est donc cohérent de supposer que ce dernier soit également responsable du sauvetage de SMARCB1. Les auteurs ont également montré que PBAF joue de façon surprenante une fonction de répresseur de tumeurs notamment en permettant l'expression de gènes de différenciation, entre autres, responsable des composantes épithéliale et mésenchymateuse des SS. Une comparaison de l'expression des différents membres de la famille BAF au sein de tumeurs de types histologiques différents serait intéressante. On peut supposer que les tumeurs biphasiques associées à un meilleur pronostic et semblant plus différenciées exprimeront une plus grande quantité de PBAF.

La dégradation de CBAF explique également la sensibilité des SS à la dégradation de BRD9 montrée récemment par une équipe américaine [365]. BRD9 étant le seul composant de ncBAF sans paralogue, sa dégradation entraîne la déstabilisation du complexe et seul PBAF reste alors fonctionnel dans la cellule, ce qui n'est probablement pas suffisant pour sa survie. Cependant, CBAF n'étant pas totalement absent dans les tumeurs, on peut malheureusement supposer que des mécanismes de résistances à la dégradation de ncBAF émergeront notamment par une régulation négative de la dégradation de CBAF.

Les travaux cumulés de ces différentes équipes sur les dix dernières années ont permis de mieux comprendre l'impact de SS18-SSX sur les complexes BAF et ont montré une modulation de l'abondance des différents sous-types de complexes. Cette modulation est schématisée dans la **Figure 39** ci-dessous. Cependant, la dégradation de CBAF étant quand même majoritairement compensée, il est peu probable qu'elle soit à l'origine de l'oncogénicité de la protéine. D'ailleurs l'équipe du Dr Kadoch a, par la suite, montré que SMARCB1 n'a pas d'impact sur la prolifération des cellules tumorales, suggérant un découplage entre le rôle de SMARCB1 et de SS18-SSX [354]. En revanche, cela explique le caractère hautement toxique de la fusion qui a pu être observé *in vivo* et *in vitro* car seules les cellules capables de compenser rapidement la perte de CBAF pourront survivre [357], [366].

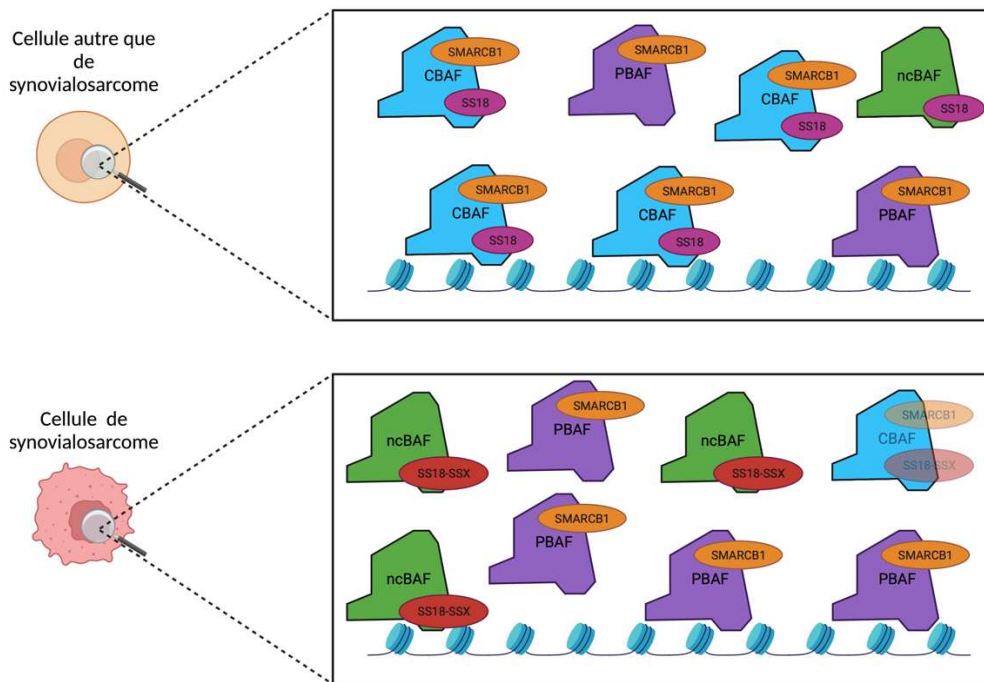


Figure 39 : Modulation de l'abondance des différents sous-types de complexe BAF par SS18-SSX

Dans les cellules autre que de SS, SS18 est présente dans les complexes CBAF et ncBAF. Les complexes CBAF sont les plus abondants. Dans les cellules de SS, SS18 est remplacé par SS18-SSX induisant alors une destruction d'une grande partie des complexes CBAF compensée par les complexes PBAF et ncBAF qui deviennent plus nombreux.

3.6.2.2 Redistribution des complexes BAF sur les domaines chromatinien occupés par polycomb

En plus d'induire la dégradation de cBAF, SS18-SSX est impliquée dans redistribution des complexes BAF sur la chromatine. Cette redistribution est associée à des pertes et des gains de fixation sur différentes régions de l'ADN [354]. En effet, McBride *et al.* ont montré que la protéine de fusion relocalise BAF engendrant son détachement des « enhancers » pour ensuite aller se fixer sur des régions beaucoup plus étendues. Cette redistribution est similaire quelle que soit la nature de la fusion et aboutit de façon directe à la réexpression de gènes impliqués dans les voies embryonnaires et neuronales et de façon indirecte à la régulation du cycle cellulaire et à la prolifération.

En essayant de comprendre la redistribution de BAF sur les larges régions spécifiques du génome, ces dernières ont été identifiées comme étant des domaines chromatinien liés à polycomb où l'on retrouve une colocalisation de la sous-unité SUZ12 des PRC2, de la marque histone H3K27me3 et de BAF. L'extinction de la protéine de fusion induit une disparition de la colocalisation de ces différents éléments suggérant ainsi que SS18-SSX est le médiateur de la co-occupation des loci par BAF et PRC2.

Cette extinction a également mis en avant, sur les larges domaines chromatinien occupés par polycomb et ciblés par BAF, une anti-corrélation entre la présence de PRC2 et l'expression des gènes. Cette anti-corrélation est perdue lorsque l'expression de la protéine de fusion est rétablie, témoignant ainsi d'un rôle de perturbation de la répression médiée par

les PRC2. L'explication la plus probable est que l'extrémité SSX de la fusion au sein du complexe BAF interagisse d'une façon encore inconnue avec PRC2 et relocalise BAF à proximité des PRC2. Comme déjà vu dans le paragraphe 3.2.1.7, BAF va alors entraîner l'éviction des PRCs et l'activation des différents gènes comme schématisé dans la **Figure 40**.

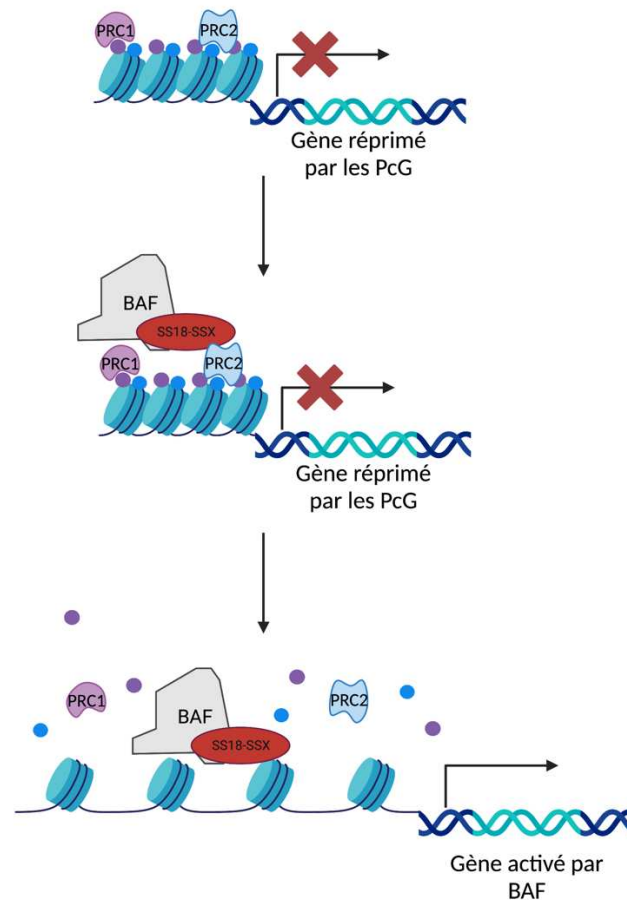


Figure 40 : Schéma de la redistribution des complexes BAF induite par SS18-SSX

La protéine SS18-SSX incorporée dans les complexes BAF interagirait avec les PRC2 via un mécanisme encore inconnu mais impliquant la région SSXRD. Cette interaction permet une relocalisation de BAF sur des domaines chromatiniens polycomb. BAF entraîne alors une éviction des complexes PRC et une activation des gènes initialement réprimés.

Au sein des larges domaines de relocalisation de BAF, on trouve une grande proportion de gènes bivalents. Si la relocalisation de BAF entraîne une diminution de la marque H3K27me3, la marque H3K4me3 reste intacte et a été qualifiée de potentiomètre de l'activation du gène. Ainsi, dans les SS, le niveau de H3K4me3 est le reflet du niveau d'activation du gène par BAF après qu'il ait médié la disparition de H3K27me3. La raison pour laquelle les gènes bivalents sont les cibles principales de la relocalisation de BAF n'a cependant pas encore été élucidée.

Ne contenant pas la fusion, PBAF, bien qu'étant le complexe le plus présent et actif dans les SS, n'est pas redistribué sur la totalité du génome et reste localisé au niveau des promoteurs proximaux tout comme l'ARN polymérase II. En revanche, il est intéressant de souligner que ces promoteurs correspondent à des gènes activés par SS18-SSX suggérant ainsi un recrutement de PBAF par les complexes BAF contenant SS18-SSX (CBAF ou ncBAF).

3.6.2.3 ncPRC1.1 dans l'oncogénicité de SS18-SSX

Le complexe ncPRC1.1 est un complexe très mal compris au sein duquel se trouve la sous-unité KDM2B. Cette dernière possède une activité d'histone déméthylase qui ne semble pourtant jouer aucun rôle dans le complexe PRC1.1. En effet, il a été montré que KDM2B n'assurerait qu'un rôle de guidage des complexes sur des loci spécifiques du génome [367]. Ces zones spécifiques de l'ADN ont été identifiées comme étant des CGIs non-méthylés.

En 2018, Banito *et al.* ont montré une interaction de SS18-SSX avec KDM2B [296]. Cette interaction implique le domaine SSXRD, la nature de cette interaction, directe ou indirecte, reste encore à établir. Ils ont par la suite montré que, au sein des CGIs non-méthylés, les protéines SS18-SSX, SMARCA4 et KDM2B colocalisent sur de nombreux loci et que cette colocalisation est associée avec une activation des gènes notamment impliqués dans les programmes de développement embryonnaire et la neurogenèse. L'extinction de KDM2B entraîne une diminution de l'occupation par SS18-SSX et SMARCA4 des loci occupés par les trois protéines dans des cellules saines. L'ensemble de ces résultats ont permis aux auteurs de proposer un modèle dans lequel les complexes BAF contenant SS18-SSX sont recrutés grâce à KDM2B sur des CGIs hypométhylés correspondant principalement à des loci réprimés par les PcGs et au sein desquels la chromatine va être rendue accessible grâce à la levée de la répression médiée par H3K27me3.

Cependant, cette théorie est critiquée par Boulay et ses collègues qui suggèrent plutôt que SS18-SSX, après l'éviction des PRC1 et PRC2, recrute ncPRC1.1 à ces loci spécifiques et non l'inverse [368]. En effet, ils soulignent le fait que SS18-SSX n'occupe pas uniquement des loci de CGIs non-méthylés et que leurs sites de fixation de prédilection sont plutôt les domaines riches en H3K27me3. De leur côté, ils proposent un modèle dans lequel SS18-SSX entraîne une redistribution du complexe BAF sur les régions chromatiniennes polycomb via un mécanisme qui reste à élucider. Au sein de ces domaines, BAF s'oppose aux complexes PcG et les évince aboutissant à un remodelage de la chromatine la rendant accessible à des facteurs de transcription. Selon les facteurs de transcription présents dans la cellule, s'en suit l'expression d'éléments de régulation génique ou l'activation de programme génique qui vont alors entraîner une transformation de la cellule. Les auteurs proposent que le recrutement de ncPRC1.1 agisse alors comme un activateur de la transcription, ce rôle lui ayant déjà été associé dans d'autres contextes. Ils proposent également l'hypothèse que la répartition de BAF sur des domaines beaucoup plus larges que les domaines habituels permet de rendre une plus grande quantité de chromatine accessible et ainsi augmenter les chances qu'un facteur de transcription présent dans la cellule puisse s'y fixer. Ils suggèrent également que le répertoire de facteurs de transcription disponible au sein de la cellule détermine la capacité de la cellule à être transformée par la protéine de fusion.

En résumé, les conséquences de l'expression de la translocation t(X;12)(p11.2;q11.2) sont nombreuses et sont causées par un chaos épigénétique au sein de la cellule complexe et peu compris à ce jour.

En effet, les différents travaux de la communauté scientifique ont mis en évidence une modification de la stœchiométrie des différentes sous-familles de complexes BAF au sein des cellules cancéreuses en entraînant une disparition importante du nombre de complexes CBAF, compensée en quasi-totalité par les autres complexes PBAF et ncBAF.

Une relocalisation de ces complexes sur des loci particuliers du génome a également été démontrée. Les caractéristiques clés de ces régions chromatiniennes sont encore

controversées, certaines équipes les décrivant comme étant des CGIs hypométhylées et d'autres comme les régions riches en H3K27me3 de façon générale. Le mécanisme par lequel BAF est redirigé sur le génome reste encore à être élucidé.

La communauté scientifique s'accorde néanmoins sur le fait qu'il y a un lien entre BAF et les PRCs au sein de ces cancers. En effet, les loci cibles sont associés à la présence des complexes PRCs qui sont alors évincés par BAF entraînant un remodelage de la chromatine alors disponible pour la transcription.

Cependant, SS18-SSX n'est pas associée uniquement à une activation de la transcription. Certains gènes se retrouvent effectivement réprimés en présence de SS18-SSX mais le mécanisme de répression est très peu décrit dans la littérature à ce jour si ce n'est via la nouvelle interaction avec ATF2 et TLE1 spécifique aux SS.

En effet, outre les conséquences épigénétiques de la translocation, les nouvelles interactions protéiques de SS18-SSX ont également leurs conséquences sur le destin de la cellule mais restent encore à être étudiées plus en profondeur.

3.7 Cellule d'origine du SS

Afin de mieux comprendre la maladie, de nombreuses études ont cherché à identifier la cellule à l'origine des SS. A ce jour, deux pistes sont étudiées : celle des progéniteurs musculaires et celle des Cellules Souches Mésoenchymateuses (CSM).

3.7.1 Progéniteurs musculaires

Bien qu'aucune des tumeurs humaines ou murines expriment des facteurs de différenciation musculaire, l'expression de SS18-SSX sous le contrôle du promoteur *MYogenic Factor 5* (*Myf5*), un marqueur de différenciation musculaire précoce, dans des souris transgéniques donne lieu à l'apparition de tumeurs dans 100% des animaux semblables à celles retrouvées chez l'Homme [357]. En revanche son expression sous le contrôle de promoteurs caractéristiques de myoblastes plus différenciés tels que *Myf6* entraînent l'apparition de myopathies mais pas de tumeurs [369]. Son expression sous le contrôle de marqueurs myogéniques plus précoces que *Myf5* tels que *Pax3* ou *Pax7* entraîne à elle une létalité embryonnaire. Encore une fois, cela témoigne de l'étroite fenêtre au cours de laquelle la cellule est permissive à une transformation par SS18-SSX.

Cette létalité embryonnaire a également été observée lors de l'expression de la protéine de fusion dans des précurseurs osseux, neuronaux ou encore endothéliaux suggérant ainsi que tous les progéniteurs cellulaires ne sont pas permissifs à la transformation [369]. Même si tous les types cellulaires ne sont pas permissifs, il semble néanmoins que les progéniteurs musculaires ne soient pas les seules cellules capables d'être transformées. En effet, l'expression ubiquitaires de SS18-SSX induite par le tamoxifène dans des modèles murins entraîne l'apparition de tumeurs à des localisations atypiques.

3.7.2 Cellules Souches Mésenchymateuses

De façon cohérente avec cette dernière observation, le potentiel des CSMs d'être les cellules à l'origine de la maladie a été investigué. Ainsi, les CSMs pourraient également être à l'origine des SS. En effet, l'expression de SS18-SSX dans des cellules C3H10T1/2 présentant des caractéristiques de CSMs a mis en évidence que ces cellules sont non seulement permissives à l'expression de SS18-SSX mais également qu'elle acquiert un profil d'expression génique ayant des similitudes avec celui des cellules de SS [370]. Cette possibilité est soutenue par le travail d'une autre équipe ayant montré que l'extinction de SS18-SSX dans les lignées cellulaires de SS Yamato et Aska leur fait perdre la capacité à former des sphéroïdes en suspension, entraînant l'expression de marqueurs mésenchymateux et leur conférant la capacité de se différencier en osteocytes, chondrocytes et adipocytes [371].

Cependant, il semble que toutes les CSMs ne sont pas permissives de la même façon à la transformation par SS18-SSX [372]. Ainsi, certaines CSMs, bien que permettant l'expression de SS18-SSX, ne montrent que des changements minimes du transcriptome. L'analyse des différentes CSMs montrent que leur paysage épigénétique n'était pas identique suggérant ainsi que la population des CSMs est hétérogène et seule une sous-population est capable de donner naissance à des tumeurs. Cela rejoint de nouveau la théorie selon laquelle la transformation des cellules par SS18-SSX ne peut se faire que lors d'une fenêtre chronologique étroite durant laquelle la cellule possède une signature épigénétique particulière.

A l'heure actuelle, un manque de marqueurs pour discriminer ces différentes sous-populations freine l'identification du type cellulaire à l'origine des tumeurs.

RÉSULTATS

**Exemple 1 : Rôle de nétrine-1 dans la plasticité
cellulaire des cellules souches cancéreuses mammaires
et ovariennes**

Rationnel et objectif du projet de recherche

Les résistances aux thérapies, telles que les chimiothérapies, radiothérapies ou encore plus récemment les immunothérapies, sont la cause majeure des récidives à la suite d'un cancer et ainsi d'une mortalité élevée à long-terme. Face à cette constatation, de nombreux efforts sont déployés afin de développer de nouvelles thérapies permettant de surmonter ces résistances. Malgré cela, elles restent encore un problème majeur à l'heure actuelle.

La découverte au début des années 2000 des cellules souches cancéreuses (CSCs) a permis d'identifier au moins une partie des cellules à l'origine de ces résistances, faisant de ces dernières une cible de choix pour améliorer la prise en charge des patients et éviter les récidives [373]. En effet, comme déjà présenté en introduction, les CSCs jouent un rôle indéniable dans la survenue des rechutes grâce à leurs propriétés d'auto-renouvellement/différenciation et de résistance aux thérapies. Le développement d'un traitement permettant de les détruire ou au moins altérer leurs propriétés fonctionnelles semble donc être la clé pour garantir une rémission totale et durable aux patients. Cependant, le développement d'une telle stratégie se heurte à un manque de connaissance sur les CSCs. Ainsi, comprendre les mécanismes par lesquels elles acquièrent et maintiennent leurs propriétés souches représentent un enjeu de taille.

À ce jour, le rôle de nétrine-1 n'est plus réduit à celui d'une simple molécule de guidage neuronal au cours du développement. En effet, une fonction en tant que molécule pléiotrope lui est également reconnue avec une implication dans différents processus comme l'angiogenèse ou encore la morphogenèse [80], [81], [374]. Cependant, son expression n'est pas limitée à des contextes physiologiques et son rôle dans des situations pathologiques comme les cancers a été décrit [89], [91], [123]. Au sein des cancers, sa fonction majoritairement dépeinte est celle de ligand des récepteurs à dépendance assurant la survie des cellules porteuses de ces récepteurs. Récemment, plusieurs travaux ont mis en avant un rôle de nétrine-1 dans les cellules souches. Par exemple, les travaux du laboratoire du Dr. Fabrice Laval montrent un rôle de nétrine-1 dans la régulation de la reprogrammation des iPS mais également le maintien et le contrôle de la pluripotence des mESCs [82], [83]. De même, nétrine-1 médie le maintien en dormance et l'auto-renouvellement des cellules souches hématopoïétiques [375].

Également, un lien entre nétrine-1 et chimiorésistance a été mis en lumière il y a quelques années. En effet, des travaux réalisés au sein du laboratoire du Dr Patrick Mehlen ont mis en évidence une surexpression de nétrine-1 et de son récepteur UNC5-B en réponse à l'exposition cellulaire à des molécules de chimiothérapie [376]. Cette réponse a été observée dans diverses lignées mais également *in vivo* dans un modèle de xénogreffe. De plus, la nature du produit chimiothérapeutique ne semble pas non plus jouer de rôle particulier car la surexpression a été constatée après traitement au Paclitaxel, à la Doxorubicine, au 5-FU ou encore au Cisplatine.

L'ensemble de ces informations nous a donc amené à nous interroger sur un potentiel rôle de nétrine-1 dans la résistance des CSCs aux chimiothérapies. En effet, des travaux ont déjà suggéré un rôle de nétrine-1 dans la survie et la prolifération des CSCs *in vitro* dans les glioblastomes [87]. Cependant ces travaux restent préliminaires et aucun lien avec la chimiorésistance n'a été exploré.

Ainsi, le but de la première partie de ma thèse a été de vérifier l'hypothèse d'un rôle putatif de nétrine-1 dans les CSCs, principalement dans le contexte des chimiorésistances, à la fois *in vitro*, *in vivo* et chez l'Homme.

Pour mener à bien cette investigation, notre choix s'est porté sur les indications des cancers du sein et des cancers de l'ovaire, des études préalables ayant montré une forte expression de nétrine-1 dans ces carcinomes [84], [85], [123]. De plus, ces cancers représentent respectivement les 2^{ème} et 5^{ème} cancer les plus fréquents chez la femme et un total de plus de 17 000 décès par an en France, l'intérêt thérapeutique est donc loin d'être négligeable. De plus, ces deux types de cancers peuvent être groupés dans la catégorie des cancers gynécologiques, qui semblent être les cancers répondeurs à la thérapie anti-nétrine 1 de l'essai clinique de phase 1 (cf. **1.5.2.2.1**).

Résultats

Au cours des presque deux premières années de ma thèse, j'ai travaillé sur la démonstration de la nétrine-1 comme acteur majeur dans la fonction "souche" des cellules tumorales et ce travail a abouti à la publication de l'article « Netrin-1 blockade inhibits tumor associated Myeloid-derived suppressor cells, cancer stemness and alleviates resistance to chemotherapy and immune checkpoint inhibitor » dans le journal « Cell Death and Differentiation » que vous trouverez à la page suivante.

Initialement commencé par le Dr. Benjamin Ducarouge durant son post-doctorat dans le laboratoire du Dr. Patrick Mehlen, ces travaux ont mis en lumière un rôle de nétrine-1 dans la survie des CSCs. J'ai ainsi pu apporter ma contribution en réalisant de nombreuses expériences, majoritairement *in vitro* sur différentes lignées cellulaires, montrant le rôle de nétrine-1 dans la survie et le maintien de la plasticité des CSCs.

Cet article est également le fruit du travail d'Anna-Rita Redavid qu'elle a réalisé dans le cadre de sa thèse « Role of Netrin-1 in tumor microenvironment » soutenue publiquement le 30/06/2020. L'essentiel du travail d'Anna-Rita a porté sur la dimension immunitaire du projet c'est-à-dire la médiation par nétrine-1 du maintien des CSCs via les *PolyMorphoNuclear Myeloid-Derived-Suppressor Cells* (PMN-MDSCs). Ses résultats ne seront donc pas discutés dans ce manuscrit bien qu'associés à la publication précédente.

De façon plus concrète, ma contribution à ces travaux a été la suivante :

- Optimisation des protocoles pour la formation de mammosphères et ovosphères et analyse du rôle de netrine-1 dans ces dernières.

- Caractérisation des marqueurs des CSCs exprimés par les différentes lignées cellulaires en lien avec l'expression de netrin-1.

Afin de pouvoir associer nétrine-1 aux CSCs, il a été nécessaire d'identifier les marqueurs des CSCs, décrits dans la littérature, exprimés dans les différentes lignées de cancers du sein (HCC70, HCC1937, Hs578t, SKBR7, T47D, BT474, MDAMB468) et de l'ovaire (OVCar3, OV90 et TOV112) que nous avons à notre disposition. J'ai réalisé le screening des différents marqueurs par cytométrie de flux. A l'issue de leur identification, j'ai participé à la réalisation des différents tris des cellules pour réaliser les expériences associées.

- Impact de nétrine-1 sur les CSCs et mécanisme d'action.

Plusieurs outils ont été développés afin d'identifier l'impact de nétrine-1 sur les CSCs et obtenir quelques informations sur le mécanisme sous-jacent. Ainsi, j'ai établi plusieurs lignées dans lesquelles l'expression de nétrine-1 et son récepteur UNC5-B était réduite ou sur-exprimée. J'ai également réalisé les expériences utilisant des siRNAs (déjà établis dans notre laboratoire) et différents inhibiteurs comme l'inhibiteur des caspases BOC.

- Réduction de la croissance tumorale par l'anti nétrine 1 NP137 dans des modèles murins

Parmi les nombreuses expériences *in vivo* présentées dans cet article, j'ai réalisé celles concernant les xénogreffes des lignées ovariennes avec BD.

ARTICLE



Netrin-1 blockade inhibits tumor associated Myeloid-derived suppressor cells, cancer stemness and alleviates resistance to chemotherapy and immune checkpoint inhibitor

Benjamin Ducarouge^{1,2,12}, Anna-Rita Redavid^{1,12}, Camille Victoor^{1,2}, Ruxanda Chira^{1,2}, Aurélien Fonseca³, Maëva Hervieu¹, Roméo Bergé^{1,2}, Justine Lengrand^{1,2}, Pauline Vieugué¹, David Neves², Isabelle Goddard¹, Mathieu Richaud¹, Pierre-Alexandre Laval¹, Nicolas Rama¹, David Goldschneider², Andrea Paradisi¹, Nicolas Gourdin⁴, Sylvie Chabaud⁵, Isabelle Treilleux⁵, Nicolas Gadot⁶, Isabelle Ray-Coquard⁶, Stéphane Depil², Didier Decaudin⁷, Fariba Némati⁷, Elisabetta Marangoni⁷, Eliane Mery-Lamarche⁸, Catherine Généstie⁹, Séverine Tabone-Eglinger¹⁰, Mojgan Devouassoux-Shisheboran¹⁰, Kathryn J. Moore¹¹, Benjamin Gibert^{1,13}✉, Patrick Mehlen^{1,2,13}✉ and Agnes Bernet^{1,2,13}✉

© The Author(s), under exclusive licence to ADMC Associazione Differenziamento e Morte Cellulare 2023

Drug resistance and cancer relapse represent significant therapeutic challenges after chemotherapy or immunotherapy, and a major limiting factor for long-term cancer survival. Netrin-1 was initially identified as a neuronal navigation cue but has more recently emerged as an interesting target for cancer therapy, which is currently clinically investigated. We show here that netrin-1 is an independent prognostic marker for clinical progression of breast and ovary cancers. Cancer stem cells (CSCs)/Tumor initiating cells (TICs) are hypothesized to be involved in clinical progression, tumor relapse and resistance. We found a significant correlation between netrin-1 expression and cancer stem cell (CSC) markers levels. We also show in different mice models of resistance to chemotherapies that netrin-1 interference using a therapeutic netrin-1 blocking antibody alleviates resistance to chemotherapy and triggers an efficient delay in tumor relapse and this effect is associated with CSCs loss. We also demonstrate that netrin-1 interference limits tumor resistance to immune checkpoint inhibitor and provide evidence linking this enhanced anti-tumor efficacy to a decreased recruitment of a subtype of myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) called polymorphonuclear (PMN)-MDSCs. We have functionally demonstrated that these immune cells promote CSCs features and, consequently, resistance to anti-cancer treatments. Together, these data support the view of both a direct and indirect contribution of netrin-1 to cancer stemness and we propose that this may lead to therapeutic opportunities by combining conventional chemotherapies and immunotherapies with netrin-1 interfering drugs.

Cell Death & Differentiation; <https://doi.org/10.1038/s41418-023-01209-x>

INTRODUCTION

Netrin-1 is a multifunctional, secreted, laminin-related glycoprotein that plays key roles in neuronal navigation, angiogenesis, and cell survival [1–3]. Netrin-1 is also implicated in numerous pathologies including type 2 diabetes, cardiovascular disease, and cancer [4–9]. Its activity has been shown to principally occur through the regulation of the signaling pathways transduced by its main receptors, Deleted in Colorectal Carcinoma (DCC) and UNC5-Homolog (UNC5H- i.e., UNC5A, UNC5B, UNC5C, UNC5D) [10, 11]. Notably, netrin-1 has been shown to be up-regulated in many tumor types, and this up-regulation has been proposed to

act as a selective mechanism that blocks apoptosis induced by the dependence receptors DCC and UNC5B [4, 12].

Efforts to develop drugs that inhibit the interaction of netrin-1 with its receptors have therefore been initiated. Several pre-clinical proof-of-concept studies have highlighted that candidate drugs interfering with netrin-1-receptor interactions markedly inhibit tumor growth and metastasis [13–16]. NP137, an anti-netrin-1 targeted monoclonal antibody strongly accumulate within netrin-1 expressing tumors and was recently evaluated in a phase I clinical trial among patients with advanced solid cancers [17, 18]. Interim results included both excellent safety profiles and

¹Apoptosis, Cancer and Development Laboratory- Equipe labellisée 'La Ligue', Labex DEVweCAN, Institut Convergence PLAsCAN, Centre de Cancérologie de Lyon, INSERM U1052-CNRS UMR5286, Université de Lyon, Centre Léon Bérard, 69008 Lyon, France. ²Netris Pharma, Centre Léon Bérard, 69008 Lyon, France. ³Research Pathology Department, Centre Léon Bérard, Lyon, France. ⁴Targeting of the Tumor and its Immune Environment, Centre de Cancérologie de Lyon, INSERM U1052-CNRS UMR5286, Université de Lyon, Centre Léon Bérard, 69008 Lyon, France. ⁵UBET, Centre Léon Bérard, Lyon, France. ⁶Pathology Department, Centre Léon Bérard, Lyon, France. ⁷Laboratory of Preclinical Investigations, Translational Research Department, Institut Curie, Université Paris-Sciences-et-Lettres, 75005 Paris, France. ⁸Department of Pathology, IUCT Oncopole, Toulouse, France. ⁹Department of Pathology, Gustave Roussy, Villejuif, France. ¹⁰Department of Pathology, Hospices Civils de Lyon, 69002 Lyon, France. ¹¹Department of Medicine, Leon H. Charney Division of Cardiology, New York University School of Medicine, New York, NY, USA. ¹²These authors contributed equally: Benjamin Ducarouge, Anna-Rita Redavid. ¹³These authors jointly supervised this work: Benjamin Gibert, Patrick Mehlen, Agnes Bernet. ✉email: benjamin.gibert@lyon.unicancer.fr; patrick.mehlen@lyon.unicancer.fr; agnes.bernet@lyon.unicancer.fr

Received: 6 September 2021 Revised: 26 July 2023 Accepted: 8 August 2023
Published online: 26 August 2023

encouraging signs of clinical activity, particularly for gynecological indications [19]. Benefits were seen in patients despite highly advanced disease resistant to standard of care, including chemotherapies and immune checkpoint inhibitors [20, 21].

A common view is that resistance to these anti-proliferative drugs is intrinsically linked to the presence of Cancer Stem Cells (CSCs) or Tumor-Initiating Cells (TICs) within the tumors. The notion is that CSCs and TICs rely on the existence of a distinct subset of tumor cells that possesses the capacity to sustain tumor growth [22]. CSCs/TICs are thought to express specific markers at the cell surface and are identified functionally based on their ability to propagate tumors when serially transplanted into recipient mice [23]. Whether CSCs are a distinct subset of cancer cells, or whether they represent a functional state of some cancer cells, remains a matter of debate. To date, the general consensus is that CSCs are key to clinical progression due to their ability to self-renew and resist chemotherapies or more recently to immune checkpoint inhibitors [24–28], thereby facilitating tumor relapse [29].

In the present study, we thus investigated netrin-1 implication in breast and ovary cancer and its putative link with cancer stemness and resistance to chemotherapy/immunotherapy. We show that netrin-1 expressed by cancer stem cells promotes resistance to anticancer drugs. We also associate netrin-1 expression with clinical progression and demonstrate that in various animal models, netrin-1 interference selectively impacts CSCs/TICs, thus potentiating sensitivity to chemotherapy and anti-CTLA-4 monoclonal Antibody (mAb) immunotherapy. Finally, we describe the integration of netrin-1 within the tumoral micro-environment and show that the anti-netrin-1 mAb inhibits tumor recruitment of a subtype of myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) called PMN-MDSCs. We provide functional evidence that these immune cells promote the CSC phenotype, and consequent resistance to anti-cancer treatments.

RESULTS

Netrin-1 expression is associated with clinical progression and cancer stemness in ovary and breast tumors

Previous studies described high-level netrin-1 expression in a sizeable fraction of human breast and ovarian cancers [13, 17, 30]. Moreover, patients with metastasis at diagnosis harbored primary tumors with greater netrin-1 expression than patients who were metastasis-free [13]. To evaluate the impact of netrin-1 on prognosis, we analyzed tumor expression of netrin-1 by quantitative-RT-PCR (q-RT-PCR) across a panel of 89 breast cancer patients treated with conventional chemotherapies, correlating netrin-1 expression data with clinical data. Clinical characteristics of the patients are presented in Supplementary Table 1. Patients bearing tumors with elevated netrin-1 expression had a significantly worse prognosis than patients bearing tumors with low netrin-1 expression. The median survival of breast cancer patient was 9.8 years in the high netrin-1 group. By contrast, the median survival was not yet reached at 15 years in the low netrin-1 group (Fig. 1A). Importantly, netrin-1 expression emerged as an independent prognostic factor in multivariate analysis, together with the presence of metastasis at diagnosis (Supplementary Table 2). To better evaluate the association between netrin-1 expression and the risk of tumor relapse or progression, we evaluated the prognostic value of netrin-1 tumor expression in the 67 patients with a localized disease, using treatment-free survival as an endpoint in this retrospective analysis. As shown in Fig. 1B, median treatment-free survival was 9.9 years for patients with high netrin-1 tumor and was not reached for low netrin-1 group.

CSCs/TICs are hypothesized to play a major role in clinical progression and tumor recurrence [22, 31, 32]. As shown in Fig. 1C, netrin-1 expression was significantly elevated in CSC marker CD44 high tumors vs CD44 low tumors ($n = 89$). Similar data were

obtained with other CSC markers (Supplementary Fig. 1A). In parallel, using fresh tumoral tissues from patients, we generated mammospheres to enrich stem-like subpopulations. We observed that netrin-1 expression is lower in the overall bulk tumor as compared to the paired mammospheres (Fig. 1D), indicating an enrichment of netrin-1 in the subpopulation of cancer cells capable of regenerating spheres.

To analyze whether the results obtained in breast cancer could be extended to other pathologies, we have investigated by immunohistochemistry (IHC) analysis the expression of netrin-1 in ovarian carcinomas (Supplementary Fig. 1B). IHCs were performed on biological samples taken at diagnosis in a cohort of 51 patients with high-grade serous ovarian carcinomas without neoadjuvant therapy. Clinical characteristics of the patients are presented in Supplementary Table 3. As shown in Fig. 1E, patients had a significantly poorer prognosis with increasing netrin-1 expression. Median survivals were respectively 9.9, 5.7 and 3.3 years in the Negative, Low and High netrin-1 groups respectively. As shown in Fig. 1F, median treatment-free survivals were respectively 5.6, 3.1 and 1.8 years for patients with Negative, Low and High expression of netrin-1 within the tumor. Similarly, netrin-1 was elevated in patients whose tumors were resistant to platinum therapy (Fig. 1G) and increasing netrin-1 was concordant with the CA-125, a circulating tumor marker known to correlate with tumor relapse (Supplementary Fig. 1C). To determine the association of netrin-1 expression with the CD44 stem marker, we performed q-RT-PCR analysis on a cohort of 31 patients with high-grade serous ovarian carcinoma. As shown in Fig. 1H, netrin-1 expression was significantly higher in High CD44 tumors than in Low CD44 tumors. Taken together, these expression data suggest that the level of netrin-1 is associated with relapse and progression of breast and ovarian tumors and that netrin-1 is specifically upregulated in CSCs/TICs compared to the bulk tumor.

The expression of netrin-1 in patient's tumors and its association with CSCs/TICs led us to investigate the link between netrin-1 expression and stem properties in a series of breast and ovarian cancer cell lines. With the idea that chemoresistance is associated with stemness, we first identified Hs578t and SKBR7 as partially chemo-sensitive to Adriamycin (i.e., ~20% of cells are still alive after 48 h of Adriamycin (Supplementary Fig. 2A)) relative to other netrin-1 positive human cell lines screened). Interestingly, following Adriamycin treatment, the surviving Hs578t and SKBR7 cells were enriched for stem cell markers such as CD44 or CD49f, as well as netrin-1 (Fig. 2A; Supplementary Fig. 2B–C). We next investigated the ability of cells to form spheres in breast and ovarian cell lines as a functional test to identify the existence of a stem cell population. BT474, Hs578t, and OV90 form spheres (Supplementary Fig. 2D) and we observed a concordant elevation of stem cell markers and netrin-1, when compared to the parental 2D cultures (Fig. 2B; Supplementary Fig. 2E). To avoid the potential bias of analyzing CSCs enrichment after chemotherapy or sphere formation, we also performed an unbiased examination of netrin-1 expression in cells after sorting for stem cell markers positivity. Hs578t, SKBR7 breast cancer cells and OV90 ovary cancer cells have been sorted for respectively CD49f, ALDH or CD44 markers positivity associated with a clear increase of netrin-1 (Fig. 2C; Supplementary Fig. 2F, G). This result highlights the association between netrin-1 and functional CSC markers in different tumor types.

In order to evaluate the involvement of netrin-1 in CSCs/TICs-mediated treatment resistance, we first took advantage of a patient-derived xenograft (PDX) immunocompromised mouse model in which a human triple negative breast tumor sample -i.e., HBC146- is grafted. This model was shown to be sensitive to a single injection of chemotherapeutic agents, such as adriamycin and cyclophosphamide [33]. Human residual disease pathology includes a remission phase during which the tumor is virtually undetectable, followed by a relapse phase in ~80% of the mice

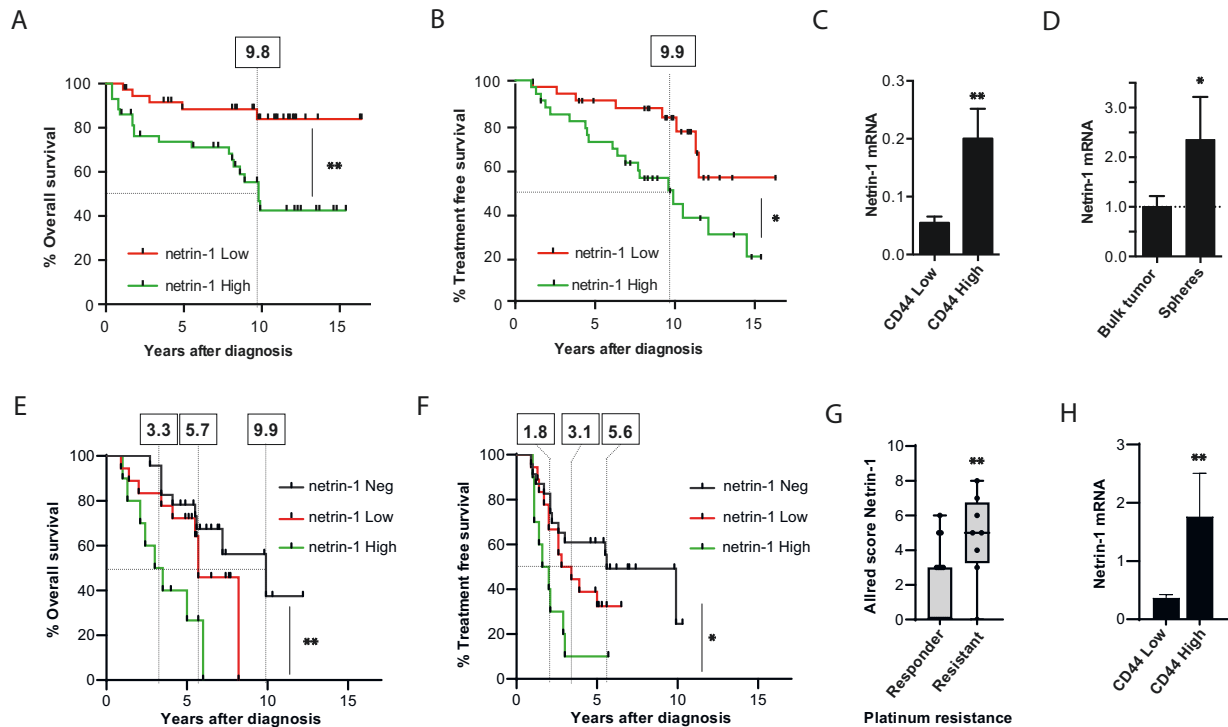


Fig. 1 Netrin-1 expression is a poor prognosis marker and correlates with stem cells marker in human breast and ovarian cancers. **A, B** Kaplan-Meier curves representing the percentage of overall survival of breast cancer patients (**A**, $n = 89$) or treatment-free survival among patients with localized disease (**B**, $n = 67$). The cohort has been split in netrin-1 High (green) and Low (red) by the median expression in their tumors. **C** Netrin-1 mRNA expression level within tumors segmented in High and Low by the median expression of CD44 mRNA ($n = 89$). Bars are mean values \pm s.e.m. **D** Netrin-1 mRNA expression level measured in fresh human tumors obtained at the diagnosis by q-RT-PCR. Each tumor was split to analyze the bulk or their corresponding derived mammospheres (Spheres, $n = 12$) after dissociation. Bars are mean values \pm s.e.m. normalized with the tumor bulk group. **E, F** Kaplan-Meier curves representing the percentage of overall survival (**E**) or treatment free survival (**F**) of high-grade ovarian carcinoma patients ($n = 51$) with netrin-1 High (green), Low (red) Negative (black) expression in their tumors (Netrin-1 was measured by immunohistochemistry (IHC)). Median netrin-1 expression was used as a cutoff between groups. **G** Boxplot presenting Allred score combining the percentage of positive cells and signal intensity of netrin-1 measured by IHC in responder patients ($n = 17$) vs patients resistant to platinum treatment ($n = 8$). **H** Netrin-1 mRNA expression level in tumors segmented on the CD44 mRNA expression from a cohort of High grade serous ovarian carcinomas ($n = 31$). High and Low have been determined respectively by the upper and lower values separated by the median of mRNA expression measured by q-RT-PCR. Bars are mean values \pm s.e.m. In all panels statistics are presented as * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

(Fig. 2D). Netrin-1 expression was relatively low in the tumor bulk during the tumor growth phase but was markedly elevated during the regression phase, returning to the basal level at the time of relapse (Fig. 2E). Of interest, netrin-1 level appears fully correlated with the presence of CD44 marker during all these stages, indicating a strong association of netrin-1 with the stem character of the tumor cells (Fig. 2E). In order to link these higher expression levels of netrin-1 and CD44 with an enrichment of CSCs during the tumor regression phase more specifically, we dissected out untreated tumors or chemotherapy-treated tumors prior to complete regression and performed CD44 analysis by flow cytometry or mammospheres forming assays. CD44^{high} cells were enriched during the regression phase (Fig. 2F). Consistent with reports of CSC resistance to chemotherapy, mammospheres formation occurred more frequently when the tumors cells used were derived immediately following chemotherapy (Fig. 2G). We then proceeded to the enrichment of tumor-initiating cells from the untreated tumor, either by CD44^{high} sorting or by mammospheres' cultures. Netrin-1 expression was enriched in CD44^{high} cells (Supplementary Fig. 2H). In line with the expression data in human breast cancer samples, netrin-1 was less expressed in bulk tumors than in mammospheres generated from these same tumors (Fig. 2H). Taken together, these data support the view that in this breast cancer PDX model, netrin-1 is only weakly expressed

in bulk tumors but is more strongly expressed in a population of tumors cells resistant to the chemotherapeutic treatment that display elevated CSC markers.

Netrin-1 blockade induces cell death and delays relapse

We and others groups have shown that netrin-1 up-regulation is a mechanism of escape from netrin-1 dependence receptor-induced apoptosis [13–16, 34]. In order to investigate the potential survival role of netrin-1 in CSC, we first knocked down netrin-1 expression by siRNA in different cell lines. Silencing of netrin-1 is associated with cell death induction in Hs578t as measured by a SubG1 assay (Fig. 2I). Moreover, this effect is increased when Adriamycin is combined as measured by cell viability (Fig. 2J). Along the same line, netrin-1 silencing impairs sphere formation ability of both Hs578t and OV90 cells (Fig. 2K).

In order to move toward a therapeutic netrin-1 targeting, a specific blocking monoclonal antibody (mAb) has been developed [17, 19]. When we examined the effect of this antibody (mAb) in the previously described HBC146-PDX model, we found that systemic delivery of the anti-netrin-1 mAb did not reveal any significant tumor growth-inhibiting effect (Supplementary Fig. 3A). This was consistent with the low level of netrin-1 expressed in this tumor. However, evaluating this together with combined chemotherapy, we observed a marked decrease of tumor regrowth at

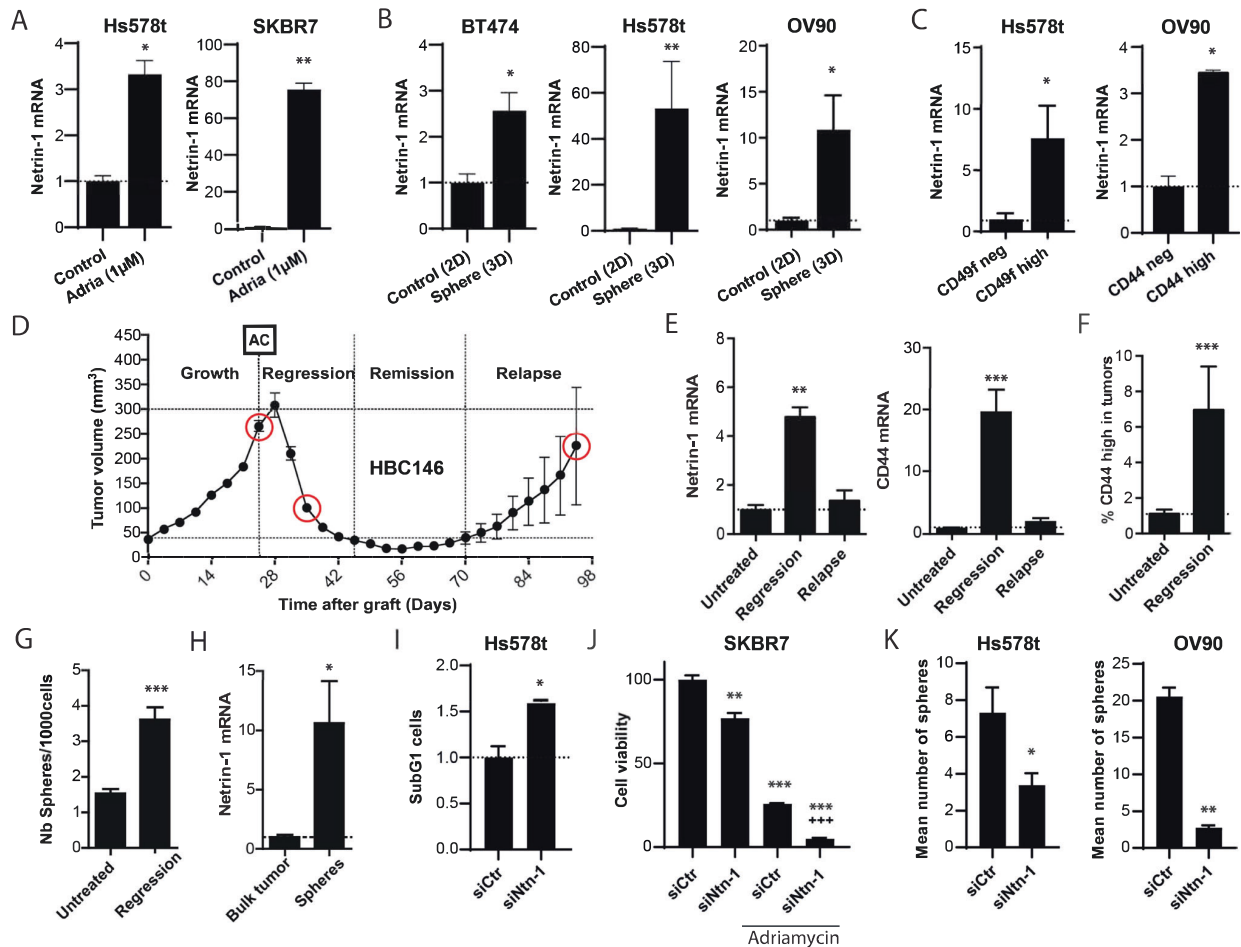


Fig. 2 Netrin-1 expression is associated with CSCs features in human cell lines and in a PDX model of breast cancer resistance to chemotherapy. **A** Netrin-1 mRNA expression level was measured by q-RT-PCR in Hs578t ($n = 3$) or SKBR7 ($n = 3$) cell lines treated 48 h with 1 μ M Adriamycin (Adria). Bars are mean values \pm s.e.m., normalized with the control group. **B** Netrin-1 mRNA expression level was measured by q-RT-PCR in BT474 ($n = 4$ vs 5), Hs578t ($n = 5$) or OV90 ($n = 6$ vs 3) cell lines comparing standard 2D culture and mammosphere (Sphere) 3D. Bars are mean values \pm s.e.m., normalized with the control 2D group. **C** Netrin-1 mRNA expression level was measured by q-RT-PCR in CD49f^{low} and CD49f^{high} Hs578t ($n = 4$) sorted breast cell population and in CD44^{low} and CD44^{high} OV90 ovary cell line ($n = 6$ vs 3). Bars are mean values \pm s.e.m., normalized with the control Low group. **D** Tumor volume was measured along the different phases of the HBC146 PDX breast cancer model [33] treated with chemotherapy Adriamycin-Cyclophosphamide (AC): Growth, Regression, Remission and Relapse ($n = 20$). Samples were collected at the different phases (red circles). **E** Netrin-1 and CD44 mRNA expression levels were measured by q-RT-PCR in the different phases (untreated $n = 8$, regression $n = 8$ and relapse $n = 10$). Bars are mean values \pm s.e.m., normalized with the untreated group. **F** Percentage of CD44^{high} cells counted by FACS analysis in untreated tumors compared to regressing tumors ($n = 9$ vs 3). **G** Number of mammospheres formed by 1000 viable cells isolated from untreated HBC146 tumors or at the regression phase ($n = 5$ vs 9). Bars are mean values \pm s.e.m. **H** Netrin-1 mRNA expression level measured by q-RT-PCR in untreated bulk tumors and mammospheres ($n = 7$). Bars are mean values \pm SEM, normalized to the bulk tumor group. **I** SubG1 cell present in Hs578t cell line treated with siRNA control (siCtrl) or siRNA against Netrin-1 (siNtn-1) ($n = 3$). **J** Cell viability measured by WST1 assay in SKBR7 ($n = 3$) cell lines treated with siCtrl and siNetrin-1 alone or in combination with Adriamycin. Bars are mean values \pm SEM, normalized to the siCtrl group (* are statistics against siCtrl and ⁺ against siCtrl + Adriamycin). **K** Number of mammospheres formed by 1000 viable cells of Hs578t ($n = 5$) and OV90 ($n = 3$) cell lines treated with siCtrl and siNetrin-1. Bars are mean values \pm SEM. In all panels statistics are presented as * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; +++ or *** $p < 0.001$.

the expected time of relapse observed in the chemotherapy-treated mice (Fig. 3A). While the relapse-free median time in chemotherapy-treated animals was 56 days, this was significantly delayed (i.e., beyond the 75 days indicating the end of the experiment) in the anti-netrin1 mAb-treated group (Fig. 3B). Consistent with a selective effect of netrin-1 blockade on CSCs/TICs, the anti-netrin1 mAb treatment was associated with an increase of cell death associated with a decrease in the number of cells able to form spheres (Fig. 3C). This result was confirmed by immunohistochemical staining of CD44, where anti-netrin-1 mAb-treated tumors showed a decrease of this stemness marker in residual cancer cells (Fig. 3D).

To more definitively test the ability of netrin-1 blockade to impact mammary TICs in this model, we next performed serial transplant assays. HBC146 breast tumors were initially grafted in mice and treated twice weekly with either anti-netrin-1 mAb or a control IgG1. After 32 days, tumors were dissociated and regrafted into new recipient mice to evaluate tumor take in the absence of further treatment. As shown in Fig. 3E, anti-netrin-1 treatment is associated with a significant reduced tumor take in HBC146 serial transplantation assay. Importantly, similar results were obtained in a second breast cancer PDX model (BRE-012) where anti-netrin-1 treatment used a monotherapy similarly failed to inhibit tumor growth (Supplementary Fig. 3B)

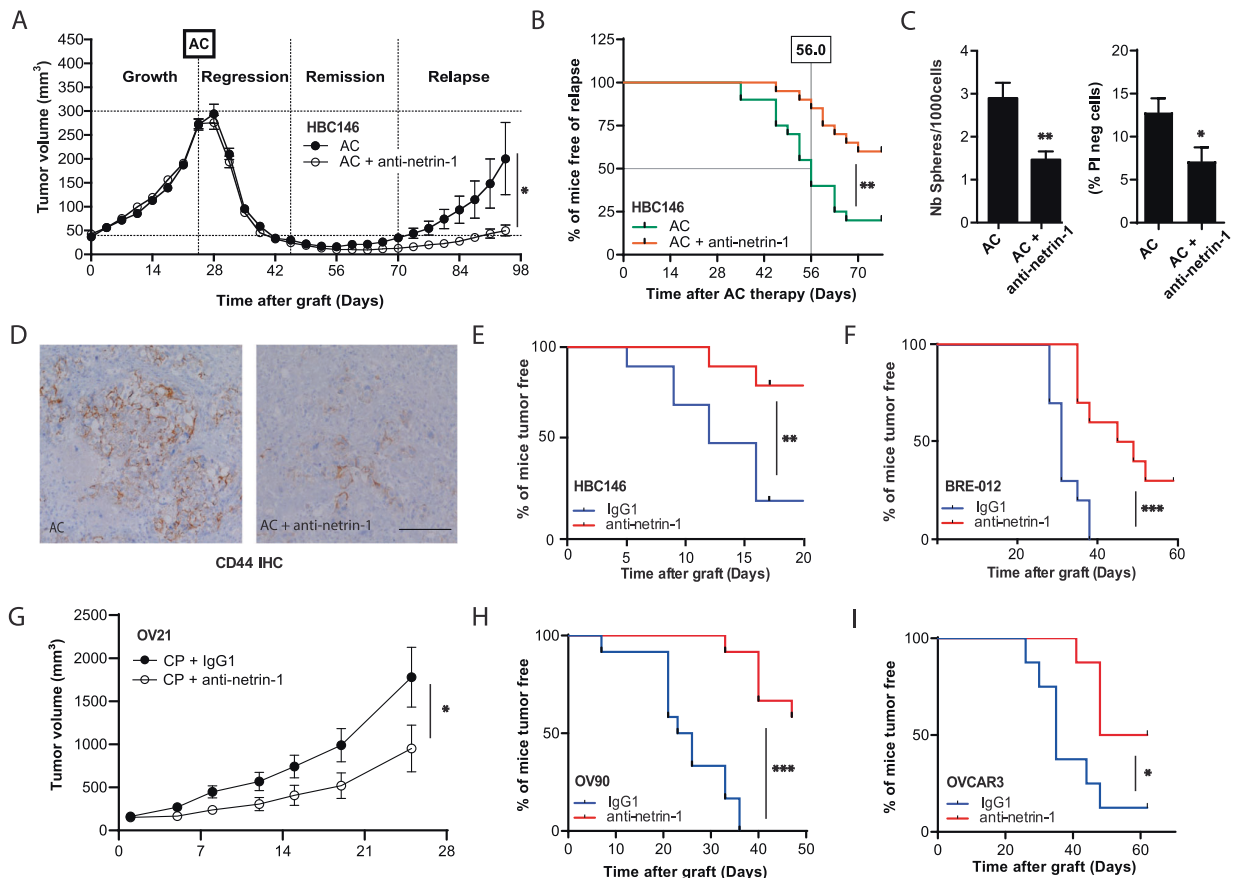


Fig. 3 Netrin-1 blockade delays cancer relapse and impact CSCs features. **A** Tumor volume was measured along the different phases of the HBC146 PDX model: Growth, Regression after chemotherapy (Adriamycin-Cyclophosphamide: AC), Remission and Relapse. At day 21, the mice were randomized into two groups which were intraperitoneally treated either by vehicle ($n = 20$) or with 10 mg/kg of anti-netrin1 antibody weekly ($n = 20$). $p = 0.0002$ by ANOVA on the tumor volume at the regression. **B** Kaplan-Meier curves representing the percent of mice free of relapse in vehicle (green) and anti-netrin-1 mAb (red) treated groups. The relapse volume threshold has been determined at 40 mm^3 . Median of relapse are respectively 56.0 and 80.5 days after chemotherapy for the vehicle and anti-netrin-1 groups, $p = 0.0078$ by Gehan-Breslow-Wilcoxon test. **C** Number of mammospheres formed by 1000 viable cells (left) or viable PI negative cells (right) isolated from HBC146 tumors treated with chemotherapy alone or associated with anti-netrin-1 mAb. Samples were collected in regressing tumors, below the volume threshold of 40 mm^3 ($n = 5$ vs 9). Bars are mean values \pm s.e.m. **D** Representative CD44 immunohistochemistry analysis of HBC146 tumors treated with chemotherapy alone or associated with the anti-netrin-1 mAb. Samples were collected in regressing tumors. Scale bar (represented by a line): $50 \mu\text{m}$. **E, F** Serial transplantation experiments of HBC146 ($n = 10$ per group) and BRE-012 ($n = 10$ per group) breast PDX. First, tumors were treated with the anti-netrin-1 mAb or with a control IgG1 and then regrafted in other mice. Secondary recipient were not treated after the re-implantation, the percentage of mice free of tumor is presented in both groups. **G** Tumor volume was measured in mice bearing the OV21 ovarian PDX model and treated with Carboplatin/Paclitaxel (CP) chemotherapy and randomly separated in two groups intraperitoneally treated either with control IgG1 ($n = 8$) or with 10 mg/kg of anti-netrin1 antibody ($n = 8$). ($p = 0.0101$; ANOVA test). **H, I** Serial transplantation experiments of ovarian cancer cell lines OV90 ($n = 12$) or OVCAR3 ($n = 8$). First, grafted tumors were treated with the anti-netrin-1 mAb or with a IgG1 control and after dissociation, 1×10^6 living cells were regrafted in new recipient mice. Results are presented as the percentage of mice free of tumor take. In all panels statistics are presented as $*p < 0.05$; $**p < 0.01$; $***p < 0.001$.

but was associated with a clear suppression of tumor take in serial transplantation assay (Fig. 3F).

To determine whether the results could be extended to other type of tumors, we next performed a combination treatment using anti-netrin-1 with the standard of care Carboplatin/Paclitaxel chemotherapy in the ovarian OV21 PDX model. Again, anti-netrin-1 mAb had no activity as a single agent (Supplementary Fig. 3C) but combining anti-netrin-1 mAb with chemotherapeutic treatment was more efficient than chemotherapy alone (Fig. 3G). Similar effects were obtained with ovarian OV90 cells xenografts (Supplementary Fig. 3D). This enhanced chemotherapy efficacy was associated with anti-netrin-1 mAb mediated inhibition of tumor take in a serial transplantation (Supplementary Fig. 3E). This was confirmed in mice engrafted with in high-grade serous

ovarian carcinoma cell lines OV90 and OVCAR3, where no inhibition of initial tumor growth was seen with the anti-netrin-1 mAb (Supplementary Fig. 3F, G) but where strong inhibition of tumor take in a serial transplantation assay was observed (Fig. 3H, I). Because in cancer settings the netrin-1 receptor involved appears to be mainly UNC5B, we have here investigated whether the impact on CSCs was dependent on UNC5B. We used CRISPR interference to invalidate UNC5B in HCC1937 breast cell line and grafted UNC5B-silenced HCC1937 in mice. We observed that the absence of UNC5B completely altered the ability to initiate tumors (Supplementary Fig. 3H). Together, these data strongly support the idea that netrin-1/UNC5B blockade has a specific impact on CSCs/TICs and prevents recurrence/resistance of breast and ovary tumors after chemotherapy.

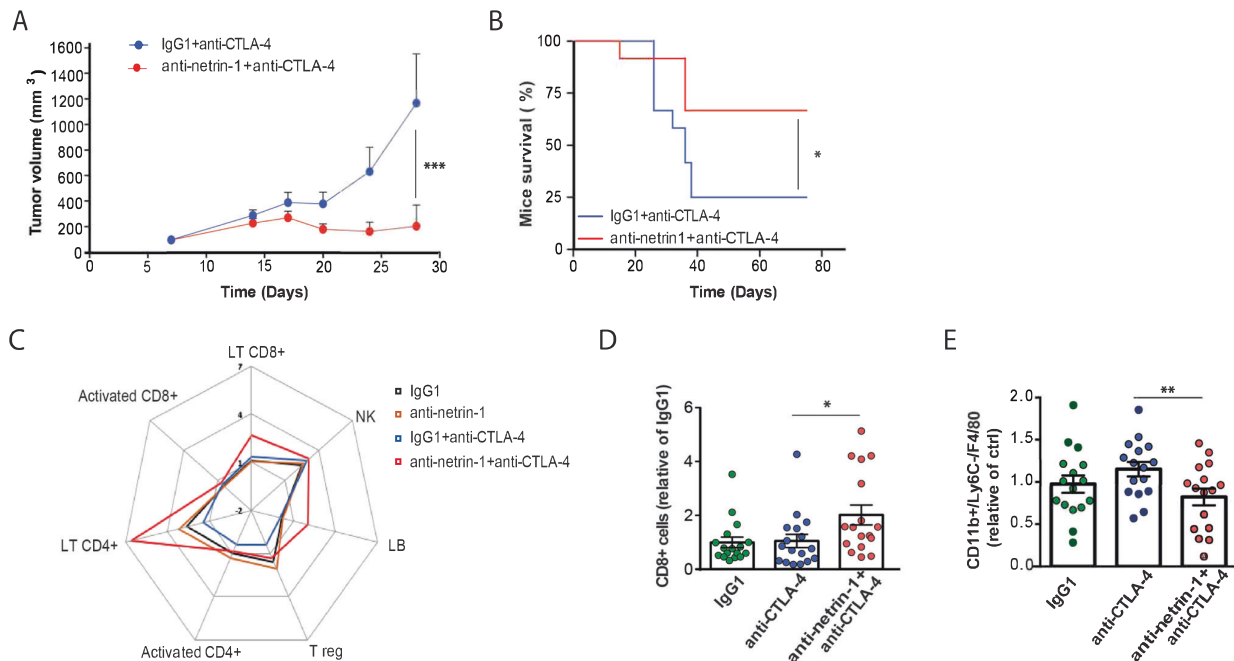


Fig. 4 Netrin-1 blockade alleviates resistance to immune checkpoint inhibitor anti-CTLA-4. **A** Tumor growth quantification of syngeneic EMT6 mammary carcinoma, in mice treated with control IgG1 or anti-netrin-1 mAb, in combination with anti-CTLA-4 mAb. **B** Kaplan-Meier survival analysis of the mice of **(A)** after 80 days. **C** Spider graph presenting flow cytometry analysis of the immune infiltrate. All components of the lymphoid panel were detected and quantified after EMT6 tumor dissociation and isolation of cell population using Lymphocytes specific antibodies. **D** Analysis of CD8⁺ lymphocytes by flow cytometry infiltrating tumors treated with either anti-CTLA-4 mAb combined or not with anti-netrin-1 mAb and compared to a IgG1 control ($n = 17$ per group). Results are the mean of 2 different experiments presented in **(C)** and are presented as a ratio on total CD45⁺ cells singlets for each tumor. **E** Analysis of tumor associated macrophages defined as CD11b⁺ LY6C⁺ F4/80⁺ cells ($n = 16$ per group). Results where the mean of 2 different experiments and are presented as a ratio on total CD45⁺ cells singlets for each tumor. In all panels statistic are presented as * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

Netrin-1 blockade alleviates resistance to immune checkpoint inhibitor therapy

Based on the impact on CSCs/TICs described here and the existing literature on cancer stemness, plasticity and resistance to immunotherapy [24, 35], we next investigated whether netrin-1 blockade might also attenuate tumor resistance to immune checkpoint inhibitor (ICPI). For this we used the mouse mammary tumor cell line EMT6, which expresses netrin-1 (Supplementary Fig. 4A) and has some susceptibility to anti-CTLA-4 [36, 37]. This model demonstrates a ~35% of tumor growth inhibition when treated with anti-CTLA-4 (Supplementary Fig. 4B), though spaghetti curves indicate that it acts as an on/off model where mice may respond or not. About 60% of mice are non-responders (Supplementary Fig. 4C). This heterogeneity is highlighted by individual animal-specific cytokine secretion profiles, which reveals “cold” and “hot” animals in terms of immune response (Supplementary Table 4).

Consistent with anti-CTLA4 activity, the level of regulatory T (T-reg) cells [38], was downregulated in all mice, but less than 40% of mice demonstrated modulation of tumor growth (Supplementary Fig. 4D). Anti-netrin-1 mAb was unable to significantly inhibit tumor growth, when used as a single agent (Supplementary Fig. 4E). However, the combination of anti-netrin-1 with anti-CTLA-4 dramatically blocked tumor growth, and strongly enhanced the long-term survival of mice bearing EMT6 tumors (Fig. 4A, B). This increased response to the anti-CTLA-4 mAb induced by netrin-1 blockade was associated with increased secretion of pro-inflammatory cytokines such as IFN γ (Supplementary Fig. 4F), suggesting a robust immune response [24, 39].

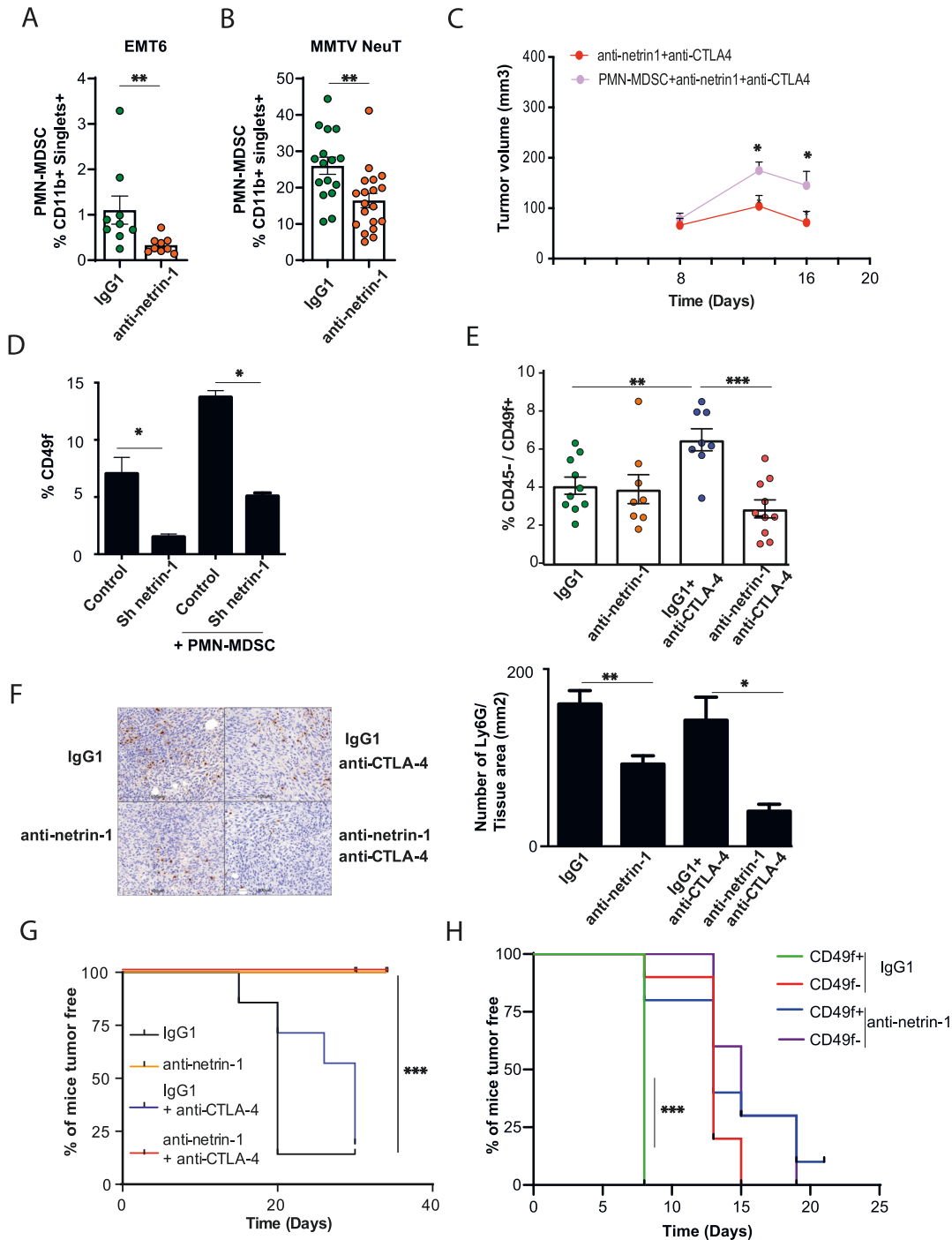
In parallel studies, we analyzed the tumor immune infiltrate using both lymphoid and myeloid panels by flow cytometry. We noticed an increase of CD8⁺ T lymphocytes within tumors of mice

treated with the combination of both antibodies, supporting the notion that immune cell populations promote the enhanced anti-tumor effect observed (Fig. 4C, D). In addition to T cell response, we analyzed the regulation of innate immunity. A decrease in tumor associated macrophages was observed within tumors of mice treated with the combination anti-netrin-1/anti-CTLA-4, supporting the view that these immune cell populations promote the enhanced anti-tumor effect observed (Fig. 4E).

PMN-MDSCs participate to netrin-1 mediated cancer stem cell enrichment and resistance to immune checkpoint inhibitors

To explore the underlying mechanisms linking immune infiltration and its possible link with the anti-netrin-1 response, we next analyzed immune subpopulations known to be involved in resistance to immune checkpoint inhibitors. We identified, in the EMT6 engrafted model, a specific decrease in PMN-MDSCs [40], a subtype of myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) derived from the neutrophil/polymorphonuclear compartment (CD11b⁺ Ly6G⁺ Ly6C^{interm}) within tumors treated with anti-netrin-1 (Fig. 5A). The same population was found to be down-regulated upon anti-netrin-1 mAb treatment in a spontaneous genetic breast cancer model MMTV/NeuT. These mice spontaneously develop mammary tumors closed to human pathology [41] (Fig. 5B).

MDSCs have been reported to be able to control and protect cancer stem cell populations [42]. PMN-MDSCs are immature cells capable of inhibiting the functions of T cells. They can accumulate during tumor growth and contribute to cancer development [40]. We thus hypothesized that these PMN-MDSCs could link the effect of netrin-1 interference on the tumor microenvironment and the resistance to treatments mediated by CSCs/TICs. To analyze in vivo the MDSC function, we differentiate immature myeloid cells into PMN-MDSCs. These immature myeloid cells were purified from



bone marrow of wild type mice and differentiated into PMN-MDSCs by treatment with IL-6 and GM-CSF, that we re-injected into EMT6 tumors, treated with anti-netrin-1 and anti-CTLA-4. As a result, the injection of PMN-MDSCs inhibits the effect of the combo-therapy highlighting the immuno-suppressive role of these cells (Fig. 5C). To analyze if PMN-MDSCs can directly impact on CSCs, we evaluated their impact on CD49f^{high} populations in a coculture model with EMT6 cells in which netrin-1 had been silenced. As shown in Fig. 5D, we observed that PMN-MDSCs sustained the CD49f⁺ stem EMT6 cell population, an

effect that was lost when netrin-1 was silenced. In vitro, PMN-MDSCs inhibit CD3⁺ T-cell proliferation and IFN γ production concomitant with the activation of cytotoxic CD8⁺ lymphocytes, which clearly demonstrates their immunosuppressive roles in this context (Supplementary Fig. 5A, B).

To determine whether the potentiation of the anti-CTLA-4 response by netrin-1 blockade was related to the impact of netrin-1 interference on CSCs/TICs, we analyzed stemness markers in EMT6 tumors treated either with anti-netrin-1 mAb alone or in combination with anti-CTLA-4. By selecting CD45⁻ non-immune cells that

Fig. 5 Netrin-1 blockade efficiently impacts CSCs/TICs untargeted by anti-CTLA-4 mAb. **A, B** Flow cytometry analysis of PMN-MDSC obtained after dissociation of EMT6 ($n = 9$ per group) or MMTV/NeuT ($n = 16$ vs 19) tumors treated with either control isotype IgG1 or anti-netrin-1 mAb. PMN-MDSC are defined as CD11b⁺ Singlets⁺ cells among the CD45⁺ (CD11b⁺ Ly6G⁺ Ly6C^{int^{term}}) population. **C** EMT-6 tumor implanted in syngeneic BALBc/J mice were treated with anti-netrin-1 and anti-CTLA4 and injected/not with PMN-MDSC cells. **D** Flow cytometry analysis of CD49f⁺ EMT6 cells in control parental cells, or netrin-1 silenced by shRNA (Sh netrin-1) cocultured, or not, with PMN-MDSC ($n = 3$). **E** Flow cytometry analysis of EMT6 cancer cells obtained after dissociation of tumors treated with either three treatments of control IgG1, anti-netrin-1 mAb alone or in combination with anti-CTLA-4 (respectively $n = 10, 8, 8$ and 10). CSC markers are defined as CD49f⁺ cells among the CD45^{neg} (CD45⁻) population. **F** Immunohistochemistry analysis and quantification of Ly6G⁺ cells in EMT6 obtained after fixation of tumors treated with either three treatments of control IgG1, anti-netrin-1 mAb with or without anti-CTLA-4. $n = 8$ field/tumor. **G** Serial transplantation experiments with EMT6 cells in syngeneic BALBc/J mice. 5.10^4 living cells, obtained after the dissociation of tumors from mice treated with either control IgG1 vs. anti-netrin-1 mAb alone; or in combination with anti-CTLA4 (respectively $n = 7, 8, 8$ and 8) were grafted into recipient mice. Results are presented as percentage of mice free of tumor. **H** Serial transplantation of EMT6 cells were used as an indicator of tumor initiating potential of CD49f^{+/−} populations. Tumors were dissociated from EMT6 tumors of mice treated with control IgG1 or anti-netrin-1 mAb. After dissociation, cells were sorted based on CD49f expression and 5.10^4 living cells of each positive or negative populations were regrafted in new recipient animals ($n = 10$ per group). Results are presented as the percentage of mice free of tumor. In all panels statistics are presented as * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

were either CD49f⁺ or CD326⁻ (murine stemness markers [26]), we found that systemic anti-CTLA-4 treatment was associated with an enhancement of the stem cell populations (Fig. 5E; Supplementary Fig. 5C). This suggests that the anti-CTLA-4 antibody principally affects bulk tumor cells, thus leaving residual tumors enriched for CSCs/TICs responsible for tumor recurrence. Moreover, we quantified at the same time point PMN-MDSCs cells by immunohistochemistry analysis (flow cytometry analysis was not possible due to a high rate of necrosis linked to CTLA-4 cytotoxic activity). We show that Ly6G⁺ cells are decreased both in the monotherapy with anti-netrin-1 mAb and in the combo with anti-CTLA-4, arguing in a protective role of these immune cells for CSCs (Fig. 5F).

We also assessed cancer stem cell function by performing a serial transplantation assay comparing anti-netrin-1, anti-CTLA-4, or the combination. As shown in Fig. 5G, while treatment with anti-netrin-1 or its combination with anti-CTLA-4 completely abolished tumor take in serially transplanted mice, treatment with anti-CTLA-4 only modestly inhibited tumor take. These data are in line with a literature suggesting that ICPIs only partially impact cancer stem cell populations [24]. Of major interest, the combination of anti-CTLA-4 and anti-netrin-1 completely inhibits the enrichment in these stem cell populations associated with anti-CTLA-4 antibody, making the combination a promising therapeutic strategy.

To further link our observations on cell subpopulations expressing stem cell markers and CSCs/TICs function, we sorted cells using CD49f and CD326 markers from untreated EMT6 transplanted tumors and then transplanted them serially. As might be predicted, we found that CD49f⁺ or CD326⁻ EMT6 cells were more prone to form tumors than their CD49f⁻ and CD326⁺ counterparts (Supplementary Fig. 5D, E). Moreover, CD49f⁺ cells sorted from tumors treated with anti-netrin-1 mAb are losing their enhanced ability to form new tumors in serial transplantation assays (Fig. 5H). As a start to understand the mechanism behind this effect, we observed that while the *in vitro* treatment of EMT6 cells with anti-netrin-1 mAb leads to the decrease of CD49f⁺ cells (Supplementary Fig. 5F), this decreased is reverted when the general caspase inhibitor BOC was added (Supplementary Fig. 5F), supporting further the view that netrin-1 blockade impacts on CSCs by affecting cell death. In order to demonstrate the role of the netrin-1 receptor in these experiments, we inactivated UNC5B by shRNA in EMT6 and identified that the knock-down of UNC5B altered the ability to initiate tumors in mice (Supplementary Fig. 5G). Collectively, our data support the view that the combination of ICPI and anti-netrin-1 is sensitizing grafted tumors to ICPI possibly because the anti-netrin-1 mAb impacts on cancer stem cell populations supported by the tumoral microenvironment.

DISCUSSION

The present data identify, for the first-time, netrin-1 as an independent progression factor in breast and high grade serous

ovarian cancers, associated with a higher expression in CSCs/TICs. We show that netrin-1 interference may not only drive tumor growth inhibition but may also be important in the prevention of tumor relapse as well as in resistance to chemotherapy or immunotherapy. In support of this notion, we identified that targeting netrin-1 in association with standard of care chemotherapies induced a significant extension of the tumor-free survival (associated with a delay in tumor relapse) in animal models of both breast and high grade ovarian serous carcinoma. Similarly, we have shown that resistance to the ICPI anti-CTLA-4 could be alleviated by the association with the anti-netrin-1 mAb.

A challenging question remains to understand the molecular mechanisms inhibited or unleashed upon netrin-1 blockade that confer relapse delay and/or alleviate resistance. We propose here that netrin-1 may play a specific role in CSCs/TICs since (i) netrin-1 is often specifically more expressed in CSCs/TICs compared to bulk tumor cells and (ii) netrin-1 blockade appears to reduce CSCs/TICs -i.e., monitored using both functional assays or markers. Although netrin-1 was initially considered as a guidance cue, several recent published works seem to describe a role of netrin-1 in induced pluripotent stem cells, embryonic stem cells and naïve pluripotency [43–45]. The link between normal and embryonic stemness has not been extended to cancer “stemness”, even though an *in vitro* study reported a possible role of netrin-1 in glioblastoma CSCs [8]. Based on an initial work from our laboratory, netrin-1 has been described as a survival factor in iPSC and ES, and acts in part in iPSC and ES by blocking the death induced by the dependence receptor UNC5B [43]. More recent work suggests that netrin-1 also links the Wnt and MAPK pathways [44]. Whether the biology behind “normal” stemness and CSCs/TICs relies on similar mechanisms should now be examined. Similarly, whether the reduction of CSCs/TICs associated with netrin-1 blockade seen in this manuscript is related to increased cell death or “lineage” commitment remains to be investigated. It worth also mentioning recent works demonstrating the role of netrin-1 in EMT [20, 21] that could possibly be linked to CSCs/TICs. Nonetheless, our work, for the first time, links netrin-1 to breast and ovarian cancer progression and suggests netrin-1 to be a bona fide clinical target. Based on these studies, a phase 2 clinical trial (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04652076>) was started in late 2020 combining anti-netrin-1 mAb and standard of care chemotherapy as well as immunotherapy.

The data obtained with the combination of ICPI with the anti-netrin-1 mAb are of specific importance taken into account the currently limited clinical activity of ICPI in breast cancer [36, 37]. The data presented here support the view that the suppression of ICPI resistance by netrin-1 blockade is associated with its impact on CSCs/TICs. However, we cannot yet exclude others additional mechanisms. Moreover, previous works have described the role of netrin-1 in the migration or the survival of immune cells such as

macrophage [4–7] or CD4⁺ cells [46] during inflammatory arthritis or obesity. MDSCs have already been reported to modulate the response to ICPI drugs [40, 47].

PMN-MDSCs have already been shown to be capable of sustaining tumor progression [40]. In our investigations, we identify that netrin-1 blockade silences these cells. We propose a novel pro-tumoral effect of immune cells that sustains CSCs/TICs and thus may indirectly affect resistance to treatment. This proposed mechanism is consistent with a mechanism in which the potentiation of ICPI by netrin-1 blockade does not necessarily occur through direct reinforcement of immune effector cells but rather through an indirect effect on CSCs/TICs. We thus propose that netrin-1 produced by cancer cells sustains PMN-MDSC which in turn sustains CSCs/TICs that contribute to both recurrence and to resistance to chemotherapies and ICPIs.

However it is fair to say it probably includes additional players of the tumor microenvironment more generally impacting on tumoral plasticity such as CAFs [48], additional immune cells, endothelial cells, and extracellular matrix but also more generally the cellular stress reported in tumoral and stromal cells [25]. Whether and how netrin-1 might interact with these additional players remains an open question.

MATERIALS AND METHODS

Ethics, human tumors samples and biological annotations

The usage of all patient tumor samples was supported according to French regulations on the protection of biomedical investigation subjects. The collection of human samples was realized with primary female breast tumors from patients treated at the Centre Léon Bérard, conserved in the Centre des Ressources Biologiques (CRB) of the Centre Léon Bérard. Informed consent was obtained from all patients, and the study use samples which were approved by the ethics committee of the institutions. Fresh samples were addressed for mammosphere formation experiments, frozen tissues for q-RT-PCR analysis and fixed tissues to immunohistochemistry.

Cell culture

All the cell lines were obtained from ATCC. Murine mammary carcinoma EMT-6 cells were cultured in Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM, ATCC) complemented with 10% of Serum Foetal Bovine (FBS, Gibco) and antibiotics (Streptomycin and Penicillin). They were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) for SKBR7 and Hs578t or RPMI for BT474, T47D, MDA-MB468, OV90 and OVCAR3, complemented with 10% FBS (Gibco) and antibiotics. HCC1937 cell line was cultured in RPMI complemented with 10% FBS (Gibco), 2% Na Bicarbonate, 1% Na Pyruvate, 1% HEPES and antibiotics. Cells were maintained in culture at 37 °C under humidified atmosphere consisting of 20% O₂ and 5% CO₂. For the CRISPRi mediated silencing of hUNC5B in HCC1937 cell line, a small guide RNA (sgRNA) targeting hUNC5B promoter was designed using the sgRNA designer tool (<https://portals.broadinstitute.org/gpp/public/analysis-tools/sgma-design-crisprai>). A control sgRNA targeting Firefly Luciferase was also designed. Sequences are as follows: sgUNC5B: 5'-GCGCGCTCTCGGAGCCCCG-3' and sgLUC: 5'-CGCCACGGCCCTTCCCGGG-3'. Forward and reverse sgRNA-coding oligos with Esp3I linkers were ordered from Eurofins Genomics and then annealed by incubation for 3 min at 90 °C and 15 min at 37 °C and ligated in pLV hU6-sgRNA hUbc-dCas9-KRAB-T2a-Puro [49]. Insertion of sgRNA was confirmed by sequencing. The use of pLV hU6-sgRNA hUbc-dCas9-KRAB-T2a-Puro allows for the simultaneous expression of dCas9-KRAB and sgRNA and for selection for puromycin resistance. 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). For the shRNA mediated KO of mUNC5B in EMT6 cell line, a pLKO.1-puro vector encoding shRNA targeting mUNC5B (Clone ID: TRCN0000072079, shRNA sequence: 5'-CGCCTACATCGTAAAGAACAA-3') was purchased from Sigma-Aldrich. Production of VSV-g pseudotyped lentivirus was made as described previously.

In vivo mice models and materials

Human anti-netrin-1 monoclonal antibodies (anti-netrin-1) were supplied by Netris Pharma (Lyon, France). Female Swiss nude mice, 6-weeks old,

were purchased from Charles River laboratories (Les Oncins, France) and maintained in specific pathogen-free conditions (Anican, Lyon, France) and stored in sterilized filter-topped cages. Their care and housing were in accordance with institutional European guidelines as put forth by the CECCAP local Ethical Committee (C2EA-15, CLB_2014_001; CLB_2014_012; CECCAPP_CLB_2016_017). The human human triple negative breast cancer patient derived xenograft PDX HBC146 was established and characterized for tumor recurrence by Marangoni et al. [33]. The human triple negative breast cancer patient derived xenograft BRE-012 was established by the IMODI consortium (<https://imodi-cancer.org/fr/>). PDX-OV21 human high grade serous ovarian carcinoma model has been established by Curie Institute and previously published [50].

For PDX experiments, mice were grafted as described by Marangoni et al., 2007 [24]. Tumor growth was evaluated by measurement of two perpendicular diameters of tumors with a caliper twice per week. Individual tumor volumes were calculated as $V = (\text{length} \times \text{width}^2) / 2$, a being the largest diameter, b the smallest. When tumors reached a volume of 300 mm³, the mice were randomly separated in two groups and submitted anti-netrin-1 or Control alone, or in combination to standard or care chemotherapy: Adriamycin, 2 mg/kg (Doxorubicin, Teva Pharmaceuticals), and cyclophosphamide, 100 mg/kg (Endoxan, Baxter) were inoculated with a single i.p. injection or Carboplatin 66 mg/Kg (generic provided by Hospira) and Paclitaxel 30 mg/Kg (generic provided by Hospira), i. p. injection once a week Anti-netrin-1 mAb or IgG1 control were i.p. injected with 10 mg/kg twice per week for the rest of the experiment. Animal work has been done by Netris pharma, Institut Curie or the Laboratoire des Modèles Tumoraux (LMT). 5 × 10⁶ OV90 and OVCAR3 cells were subcutaneously inoculated with Matrigel (Corning) in the dorsal flank of 8-week-old female Swiss/Nude mice. The mice were housed under specific pathogen free (SPOF) conditions (Anican, Lyon, France). Tumor volumes were evaluated approximately every 3 days after initial detection using calliper [51].

For experiments of immune checkpoints inhibitors, eight-week-old (20–22 g body weight) female Balb/CJ mice were obtained from Janvier Labs. 1 × 10⁶ EMT-6 cells were subcutaneously inoculated in the dorsal flank of 8-week-old female BALB/CJ wild-type mice. The mice were housed under specific pathogen free (SPF) conditions as previously described (Anican, Lyon, France) [52]. Tumor volumes were evaluated approximately every 2 days after initial detection using calliper [51]. Based on initial intra-group homogeneity of tumor size, four different treatments have been administered: IgG1 control isotype (Netris Pharma), anti-netrin-1 mAb (NP137, Netris Pharma) combination of anti-CTLA-4 mAb (BioXCell, Clone 9H10) with IgG1 and combination of anti-CTLA-4 with anti-netrin-1 mAb. The treatments were ip. administered respecting the following dose: 20 mg/kg anti-CTLA-4, 10 mg/kg anti-netrin-1 and 10 mg/kg mice IgG1 on days 8, 11 and 14 after the implant. Mice were sacrificed when individual tumours reached a predefined endpoint (1000–2000 mm³).

For the injection of MDSCs cells, 500,000 EMT6 breast cancer cells were mixed with 50,000 PMN-MDSCs (ratio 10:1) produced in vitro and were inoculated in the dorsal flank of 8-week-old female BALB/CJ wild-type mice. Subsequently mice were intratumorally inoculated with PMN-MDSC at day 8 and 13.

Serial transplantation, tumor-initiating cell sorting and mammosphere culture

Tumors were dissociated with a collagenase (Sigma Aldrich)/DNase (Life Technologies) for 45 min at 37 °C, submitted to red blood cell lysis (Miltenyi Biotec) and passed through a 30 μm filter to obtain a single cell suspension. Cell viability has been evaluated by trypan blue count under the microscope to ensure the engraftment of the same number of cells with a similar viability in the different conditions of treatment, residual cells were after analyzed and sorted by FACS or submitted to mammosphere formation. FACS sorting was performed on a BD FACSDiVa. Anti-CD44-PE (BD system) was used to count and sort CD44^{high} cells and dead cells were counted with propidium iodine staining. ALDEFLUOR (Stemcell Technologies) was used to count and sort ALDH^{high} cells and dead cells were counted with propidium iodine staining. Mammosphere enrichments were obtained by culturing the cells on 6 wells ultra-low attachment dishes in mammo-cult medium (Stem cell technologies). Cells were allowed to form clonal mammospheres for 7 to 10 days of culture. For mammosphere forming assays, viable singlets were sorted by FACS and directly plated on 96 wells ultra-low attachment dishes at the density of 1000 cells per well in mammo-cult medium. Mammospheres were counted after 7 days of culture. To analyze spheres passages, 7 days spheres were dissociated and

1000 cells per well were again plated in the conditions mentioned above and counted after 7 days of culture.

Immunohistochemistry

Immunohistochemistry analysis was performed on 4- μ m-thick sections of paraffin embedded mouse tissues stained with anti-CD44 (156-3C11, Thermo Fisher) or anti-netrin-1 (ab126729, Abcam) or anti-Ly-6G (E6Z1T-Rabbit mAb #87048 Cell signaling) dilution 1/500. Expressions are revealed by brown DAB staining. Nuclei are counterstained by hematoxylin (blue).

Flow cytometry analysis

EMT6 subcutaneous tumors were mechanically disaggregated in RPMI-1640 medium 5% FBS and enzymatically digested with 1 mg/ml of collagenase I and 40 U/ml of DNase I (Sigma Aldrich) for 30 min at 37 °C. Cells were passed through a 70 μ m-cell strainer and filtered. After RBC lysis, cells were passed through a 30 μ m-cell strainer and filtered. Cell pellets were resuspended in HBSS (Gibco) before counting. 2×10^6 cells were stained for the viability with Zombie Aqua (Biolegend) for 30 min at 4 °C. Cells were washed and incubated with Fc Block purified anti-mouse CD16/CD32 (Clone 93, Biolegend), followed by staining with mouse anti-CD4 (RM4-5, Brilliant Violet 785), anti-CD19 (6D5, Brilliant Violet 605), anti-Nkp46 (29A1.4, PE), anti-CD45 (30-F11, Alexa Fluor 700), anti-CD25 (PC61, APC), anti-CD69 (H1.2F3, FITC), anti-IA-IE (M5/114.15.2, BV421), anti-Ly6C (HK1.4, APC-Cy7) anti-Ly6G (1A8, FITC), CD11b (M1/70, BV785) and F4/80 (BM8, APC) from Biolegend and anti-CD3 (clone 500A2, PerCP-eFluor 710, anti-CD8b (eBioH35-17.2, eFluor 450), anti-CD44 (IM7, PerCP-Cy5.5), anti-CD326 (G8.8, PE-Dazzle 594) from eBioscience, anti-CD49f (GoH3, eFluor 450) from Life Technologies, for 45 min at 4 °C. Cells were fixed and permeabilized with the Foxp3 transcription factor staining buffer set (eBiosciences), and overnight stained for 30 min at 4 °C for IFN γ (XMG1.2, PE, Biolegend) and with anti-Foxp3 (FJK-16s, PE-Cyanine7, eBioscience). Analyses were performed with Fortessa HTS flow cytometer (BD Biosciences). Data were analyzed with FlowLogic Version 6 (Miltenyi Biotec, Germany). All gates were defined using fluorescence minus one control (FMO).

Cell isolation

CD3⁺ T-cells were isolated from the Lymph nodes of 7-week-old BALB/cJ wild-type mice. The separation was performed by using Pan T Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec) and MACS column. Purity of cell population were evaluated by flow cytometry. CD3⁺ T-cells were cultivated in-vitro for 3-days with Anti-CD3 and Anti-CD28 (DynaBeads, Gibco) and IL-2 (10 ng/ml). Immature myeloid cells were purified from bone marrow of 7-week-old BALB/cJ wild-type mice. Red blood cells (RBC) were lysate with ACK (Ammonium-Chloride-Potassium) Lysing Buffer, cells were filtered through a 70 μ m-cell strainer. Immature myeloid cells were cultivated in-vitro for 4-days with GM-CSF and IL-6 (40 ng/ml) to differentiate them. T-cells and PMN-MDSCs were cultivated in RPMI complemented with 10% FBS (Gibco), 1% Na Bicarbonate, 1% Na Pyruvate, 1% L-glutamine (Gibco), 1% HEPES, 0.05 mM 2-mercaptoethanol (Gibco) and antibiotics.

Proliferation viability and cell death assays

CD3⁺ T-cells were labeled with cell trace violet (CTV, Invitrogen) as follows: 10^6 cells were incubated with 1 μ M of CTV in PBS for 20 min at 37 °C, 5% CO₂. 5-volume of culture medium were added, and cells were left at 37 °C 5% CO₂ in culture medium for additional 5 min. Cells were analyzed by flow cytometry for the proliferation baseline or co-cultured with PMN-MDSCs. WST1 assay was used according to the manufacturer (Cell proliferation Reagent, Roche) to measure cell viability. Cells are fixed in 70% Ethanol and stained with Propidium iodide (PI). SubG1 population is further identified by flow cytometry.

IFN- γ production

Activated CD3⁺ T-cells were stimulated with phorbol myristate acetate (PMA), Ionomycin, Brefeldin (Biolegend) and Monensin (Biolegend) for 4 h at 37 °C, 5% CO₂ in complete culture medium. IFN γ released by CD8⁺ T-cells was evaluated by flow cytometry.

Co-culture

To test the immunosuppressive activity of PMN-MDSCs were co-cultured with purified CD3⁺ T-cells for 3 days at different ratio (MDSCs: CD3⁺ T-cells, 1:1, 1:4) in 96-well plate. To analyze the effect PMN-MDSCs on stemness

were co-cultured with EMT6-control vector EMT6-Sh netrin-1 in a ratio 1:10 (MDSCs: Tumoral cells) for 24 h in 24 well plate. CD49f^{high} cells were analyzed by flow cytometry.

Cytokine analysis

To measure the systemic release of IFN γ , fresh stabilized whole blood was drawn from BALB/cJ wild-type mice 16 h h after 1st, 2nd and 3rd treatments. Plasma was separated and used to measure the protein levels of IFN γ with the Mouse IFN-gamma Quantikine ELISA Kit (R&D System, Minnesota, USA) according to the manufacturer's instructions.

For cytokines array analysis, 31 cytokines and chemokines were analyzed 18 h after the 2nd CTLA-4 treatment, using the multiplex assays manufactured by Meso Scale Discovery (MSD; Gaithersburg, MD). EMT6 subcutaneous tumors were mechanically disaggregated in 500 μ l of RPMI-1640 medium (in absence of FBS) for 500 mg of tumor. The cytokines and chemokines analyzed according to the manufacturer recommendations and were IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12p70, IL-15, IL-16, IL-17A, IL-17A/F, IL-17C, IL-17E/IL-25, IL-21, IL-22, IL-23, IL27p28/IL30, IL-31, IL-33, IFN γ , MIP-1 α , MIP-2, MIP-3 α , IP-10, MCP-1, KC/GRO, TNF- α , TGF- β 2, TGF- β 3, TGF- β 1. Analyses were performed using the software Discovery workbench 4.0.

Immunoblots

Confluent cells were washed with cold PBS and scrapped in lysis buffer (Tris 10 mM pH 7.6; SDS 5; Glycerol 10%; Triton X-100 1%, DTT 100 mM). After sonication proteins were dosed using Pierce 660 nm Protein Assay Reagent (Thermo Fisher Scientific) and after loading on 4–15% SDS-polyacrylamide gels (Bio-Rad) transferred to nitrocellulose membranes using Trans-Blot Turbo Transfer (Bio-Rad). Membranes were blocked for 1 h at room temperature with 5% of nonfat dried milk for the Netrin-1 and with 5% of BSA and 1% of nonfat dried milk for UNC5B. Staining was performed overnight with primary antibody: anti-netrin1 antibody (Ab126729, Abcam) and anti-UNC5B (D9M7Z, Cell signaling technology). After washing, membranes were incubated with secondary antibody, goat anti-rabbit coupled with HRP for 1 h at room temperature. West Dura Chemiluminescence System (Pierce) was used to intensify the signal. Imaging was performed using Chemidoch Touch (Bio-Rad). Full membrane westernblots were included in the supplementary material.

RNA expression analysis

Total mRNAs were extracted from tissues or cells using Nucleospin RNAiI kit (Macherey-Nagel) and 1 μ g was reverse transcribed using the iScript cDNA Synthesis kit (Bio-Rad). Real-time quantitative RT-PCR was performed on a LightCycler 2.0 apparatus (Roche, Meylan, France) using the Light Cycler Master Taqman kit (Roche, Meylan, France). Oligonucleotide sequences are available upon request.

Statistical analysis

To test netrin-1 expression, cohorts were dichotomized based on Netrin-1 median expression. Survival curves were produced by the Kaplan-Meier method on Prism (GraphPad Software, San Diego, California). Data were analyzed using a Mantel-Cox test. *n* defines the total number of replicates. All statistical tests were two-sided. The multivariate analysis was realized with COX model in the R software. Kaplan-Meier curves of disease-free survival of overall survival were analyzed with a Gehan-Breslow-Wilcoxon Test in the GraphPad Prism software.

For mice experiments, statistical methods were not used to predetermine necessary sample size, but sample size was chosen based on pilot experiments which applying appropriate statistical test could return significant results. Tumor growth with time was analyzed by two-way ANOVA with Bonferroni correction. Survival curves were analyzed using the Log-rank (Mantel-Cox) test. Flow cytometry data are reported as mean \pm s.e.m. in case of representative experiment; the pool of different experiments is expressed as a *ratio* of the control group of the single experiment. Statistical analysis was performed by Mann-Whitney test (GraphPad).

REFERENCES

- Serafini T, Colamarino SA, Leonardo ED, Wang H, Bedington R, Skarnes WC, et al. Netrin-1 is required for commissural axon guidance in the developing vertebrate nervous system. *Cell*. 1996;87:1001–14.
- Chédotal A. Roles of axon guidance molecules in neuronal wiring in the developing spinal cord. *Nat Rev Neurosci*. 2019;20:380–96.

3. Mehlen P, Delloye-Bourgeois C, Chédotal A. Novel roles for slits and netrins: axon guidance cues as anticancer targets? *Nat Rev Cancer*. 2011;11:188–97.
4. Mehlen P, Bredesen DE. Dependence receptors: from basic research to drug development. *Sci Signal*. 2011;4:mr2.
5. Bongo JB, Peng DQ. The neuroimmune guidance cue netrin-1: a new therapeutic target in cardiovascular disease. *J Cardiol*. 2014;63:95–8.
6. van Gils JM, Derby MC, Fernandes LR, Ramkhalawon B, Ray TD, Rayner KJ, et al. The neuroimmune guidance cue netrin-1 promotes atherosclerosis by inhibiting the emigration of macrophages from plaques. *Nat Immunol*. 2012;13:136–43.
7. Ramkhalawon B, Hennessy EJ, Ménager M, Ray TD, Sheedy FJ, Hutchison S, et al. Netrin-1 promotes adipose tissue macrophage retention and insulin resistance in obesity. *Nat Med*. 2014;20:377–84.
8. Sanvoranart T, Supokawej A, Kheolamai P, U-pratya Y, Pongvarin N, Sathornsumetee S, et al. Targeting Netrin-1 in glioblastoma stem-like cells inhibits growth, invasion, and angiogenesis. *Tumor Biol*. 2016;37:14949–60.
9. Barnault R, Verzeroli C, Fournier C, Michelet M, Redavid AR, Chicherova I, et al. Hepatic inflammation elicits production of proinflammatory netrin-1 through exclusive activation of translation. *Hepatology*. 2022;76:1346–59.
10. 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.
11. Leonardo ED, Hinck L, Masu M, Keino-Masu K, Ackerman SL, Tessier-Lavigne M. Vertebrate homologues of *C. elegans* UNC-5 are candidate netrin receptors. *Nature*. 1997;386:833–8.
12. Gibert B, Mehlen P. Dependence receptors and cancer: addiction to trophic ligands. *Cancer Res*. 2015;75:5171–5.
13. Fitamant J, Guenebeaud C, Coissieux M-M, Guix C, Treilleux I, Scoazec J-Y, et al. Netrin-1 expression confers a selective advantage for tumor cell survival in metastatic breast cancer. *Proc Natl Acad Sci*. 2008;105:4850–5.
14. Delloye-Bourgeois C, Fitamant J, Paradisi A, Cappellen D, Douc-Rasy S, Raquin M-A, et al. Netrin-1 acts as a survival factor for aggressive neuroblastoma. *J Exp Med*. 2009;206:833–47.
15. Delloye-Bourgeois C, Brambilla E, Coissieux M-M, Guenebeaud C, Pedeux R, Firlej V, et al. Interference with netrin-1 and tumor cell death in non-small cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2009;101:237–47.
16. 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.
17. Grandin M, Meier M, Delcros JG, Nikodemus D, Reuten R, Patel TR, et al. Structural decoding of the Netrin-1/UNC5 interaction and its therapeutic implications in cancers. *Cancer Cell*. 2016;29:173–85.
18. Kryza D, Wischhusen J, Richaud M, Hervieu M, Sidi Boumedine J, Delcros J, et al. From netrin-1-targeted SPECT/CT to internal radiotherapy for management of advanced solid tumors. *EMBO Mol Med*. 2023;15:e16732.
19. Cassier P, Eberst L, Garin G, Courbebaissse Y, Terret C, Robert M, et al. A first in human, phase I trial of NP137, a first-in-class antibody targeting netrin-1, in patients with advanced refractory solid tumors. *Ann Oncol*. 2019;30:v159.
20. Cassier PA, Navaridas R, Bellina M, Rama N, Ducarouge B, Hernandez-Vargas H, et al. Netrin-1 blockade inhibits tumour growth and EMT features in endometrial cancer. *Nature*. 2023. <https://doi.org/10.1038/s41586-023-06367-z>.
21. Lengrand J, Pastushenko I, Vanuytven S, Song Y, Venet D, Sarate RM, et al. Pharmacological targeting of netrin-1 inhibits EMT in cancer. *Nature*. 2023. <https://doi.org/10.1038/s41586-023-06372-2>.
22. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*. 2001;414:105–11.
23. Yeung TM, Gandhi SC, Wilding JL, Muschel R, Bodmer WF. Cancer stem cells from colorectal cancer-derived cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010;107:3722–7.
24. Miao Y, Yang H, Levorse J, Yuan S, Polak L, Sribour M, et al. Adaptive immune resistance emerges from tumor-initiating stem cells. *Cell*. 2019;177:1172–86.
25. Lu H, Xie Y, Tran L, Lan J, Yang Y, Murugan NL, et al. Chemotherapy-induced S100A10 recruits KDM6A to facilitate OCT4-mediated breast cancer stemness. *J Clin Invest*. 2020. <https://doi.org/10.1172/JCI138577>.
26. Battle E, Clevers H. Cancer stem cells revisited. *Nat Med*. 2017;23:1124–34.
27. Ye L, Lin C, Wang X, Li Q, Li Y, Wang M, et al. Epigenetic silencing of SALL 2 confers tamoxifen resistance in breast cancer. *EMBO Mol Med*. 2019;11. <https://doi.org/10.15252/emmm.201910638>.
28. Arfaoui A, Rioualen C, Azzoni V, Pinna G, Finetti P, Wicinski J, et al. A genome-wide RNA i screen reveals essential therapeutic targets of breast cancer stem cells. *EMBO Mol Med*. 2019;11. <https://doi.org/10.15252/emmm.201809930>.
29. Junttila MR, de Sauvage FJ. Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response. *Nature*. 2013;501:346–54.
30. Papanastasiou AD, Pampalakis G, Katsaros D, Sotiropoulou G. Netrin-1 overexpression is predictive of ovarian malignancies. *Oncotarget*. 2011;2:363–7.
31. Ginestier C, Hur MH, Charafe-Jauffret E, Monville F, Dutcher J, Brown M, et al. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell*. 2007;1:555–67.
32. Charafe-Jauffret E, Ginestier C, Iovino F, Tarpin C, Diebel M, Esterni B, et al. Aldehyde dehydrogenase 1-positive cancer stem cells mediate metastasis and poor clinical outcome in inflammatory breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2010;16:45–55.
33. Marangoni E, Lecomte N, Durand L, de Pinieux G, Decaudin D, Chomienne C, et al. CD44 targeting reduces tumour growth and prevents post-chemotherapy relapse of human breast cancers xenografts. *Br J Cancer*. 2009;100:918–22.
34. 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.
35. Dongre A, Rashidian M, Reinhardt F, Bagnato A, Keckesova Z, Ploegh HL, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition contributes to immunosuppression in breast carcinomas. *Cancer Res*. 2017;77:3982–9.
36. Bayraktar S, Batoo S, Okuno S, Glück S. Immunotherapy in breast cancer. *J Clin Oncol*. 2019;37:182.
37. Polk A, Svane I-M, Andersson M, Nielsen D. Checkpoint inhibitors in breast cancer – current status. *Cancer Treat Rev*. 2018;63:122–34.
38. Read S, Greenwald R, Izcue A, Robinson N, Mandelbrot D, Francisco L, et al. Blockade of CTLA-4 on CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells abrogates their function in vivo. *J Immunol*. 2006;177:4376–83.
39. Ni L, Lu J. Interferon gamma in cancer immunotherapy. *Cancer Med*. 2018;7:4509–16.
40. Zhou J, Nefedova Y, Lei A, Gabrilovich D. Neutrophils and PMN-MDSC: their biological role and interaction with stromal cells. *Semin Immunol*. 2018;35:19–28.
41. Guy CT, Webster MA, Schaller M, Parsons TJ, Cardiff RD, Muller WJ. Expression of the neu protooncogene in the mammary epithelium of transgenic mice induces metastatic disease. *Proc Natl Acad Sci*. 1992;89:10578–82.
42. Peng D, Tanikawa T, Li W, Zhao L, Vatan L, Szeliga W, et al. Myeloid-derived suppressor cells endow stem-like qualities to breast cancer cells through IL6/STAT3 and NO/NOTCH cross-talk signaling. *Cancer Res*. 2016;76:3156–65.
43. Ozmadenci D, Féraud O, Markossian S, Kress E, Ducarouge B, Gibert B, et al. Netrin-1 regulates somatic cell reprogramming and pluripotency maintenance. *Nat Commun*. 2015;6:7398.
44. Huyghe A, Furlan G, Ozmadenci D, Galonska C, Charlton J, Gaume X, et al. Netrin-1 promotes naive pluripotency through Neo1 and Unc5b co-regulation of Wnt and MAPK signalling. *Nat Cell Biol*. 2020;22:389–400.
45. Renders S, Svendsen AF, Panten J, Rama N, Maryanovich M, Sommerkamp P, et al. Niche derived netrin-1 regulates hematopoietic stem cell dormancy via its receptor neogenin-1. *Nat Commun*. 2021;12:608.
46. Boneschansker L, Nakayama H, Eisenga M, Wedel J, Klagsbrun M, Irimia D, et al. Netrin-1 augments chemokinesis in CD4⁺ T cells in vitro and elicits a proinflammatory response in vivo. *J Immunol*. 2016;197:1389–98.
47. Lu W, Yu W, He J, Liu W, Yang J, Lin X, et al. Reprogramming immunosuppressive myeloid cells facilitates immunotherapy for colorectal cancer. *EMBO Mol Med*. 2021;13. <https://doi.org/10.15252/emmm.202012798>.
48. Sung P-J, 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.
49. Thakore PI, D'Ipollito AM, Song L, Safi A, Shivakumar NK, Kabadi AM, et al. Highly specific epigenome editing by CRISPR-Cas9 repressors for silencing of distal regulatory elements. *Nat Methods*. 2015;12:1143–19.
50. Mieulet V, Garnier C, Kieffer Y, Guilbert T, Nemati F, Marangoni E, et al. Stiffness increases with myofibroblast content and collagen density in mesenchymal high grade serous ovarian cancer. *Sci Rep*. 2021;11:4219.
51. Gibert B, Delloye-Bourgeois C, Gattolliat C-H, Meurette O, Le Guernevel S, Fombonne J, et al. Regulation by miR181 family of the dependence receptor CDON tumor suppressive activity in neuroblastoma. *J Natl Cancer Inst*. 2014;106. <https://doi.org/10.1093/jnci/dju318>.
52. Jiang S, Richaud M, Vieugue P, Rama N, Delcros J, Siouda M, et al. Targeting netrin-3 in small cell lung cancer and neuroblastoma. *EMBO Mol Med*. 2021. <https://doi.org/10.15252/emmm.202012878>.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dwayne Stupack for correction and helpful discussion, the LMT platform for the high quality of the animal work. This work was supported by Netris Pharma and institutional grants from CNRS (PM, BG), University of Lyon (PM), Centre Léon Bérard (PM) and from the Ligue Contre le Cancer (PM), INCA (PM), Euronanomed (PM, BG),

ANR (PM), BMS Foundation for Immunotherapy (PM). AR received a 4th year fellowship from Ligue contre le Cancer.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

BD, ARR, CV, RC, RB, AP and JL performed the cell experiments and in vitro data; BD, ARR, MH, PV, DN, MR, IG, FN and PAL performed mice experiments; CV, RB, AP and DG produced the lentiviruses and CRISPR and Sh cell lines; BD, AF, IT and NG made anatomopathological analysis; NR performed bioinformatical analysis; NG, IT, IRC, EML, CG, STE and MDS provided human samples and cell lines; BD, ARR and SC performed statistical analysis; BD, ARR, SD, DD, EM, KJM, BG, PM and AB have participated to the research design and to write the paper.

COMPETING INTERESTS

BD, CV, JL, DN, DG, SD, AB and PM declare to have a conflict of interest as respectively employees (BD, DN, DG, CV, JL and SD) and shareholders (AB and PM) of NETRIS Pharma.

ADDITIONAL INFORMATION

Supplementary information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41418-023-01209-x>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to Benjamin Gibert, Patrick Mehlen or Agnes Bernet.

Reprints and permission information is available at <http://www.nature.com/reprints>

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Springer Nature or its licensor (e.g. a society or other partner) holds exclusive rights to this article under a publishing agreement with the author(s) or other rightsholder(s); author self-archiving of the accepted manuscript version of this article is solely governed by the terms of such publishing agreement and applicable law.

Netrin-1 blockade inhibits tumor associated Myeloid-derived suppressor cells, cancer stemness and alleviates resistance to chemotherapy and immune checkpoint inhibitor

Benjamin Ducarouge, Anna-Rita Redavid *et al.*

Supplementary figures and tables

Supplementary Table and Figures:

Supplementary Table 1: Clinical parameters of the breast cancer patient's cohort.

Clinical data of patient analyzed in **Fig. 1A-D** (n=89). Table presenting patients repartition in netrin-1 high and low groups according to clinical data, in the whole cohort (left) and in the cohort with localized tumors (right). Abbreviations: Ntn1; netrin-1, M; Metastasis, N; lymph node invasion, SBR; Scarff-Bloom-Richardson grade, ER; Estrogen Receptor, PR; Progesterone Receptor, Her2; epidermal growth factor 2, Hormono / Radiation / Chemo; patients treated respectively with hormonotherapy, Radiation or Chemotherapy. Each parameter is independently compared in netrin-1 high and low groups.

Supplementary Table 2: Multivariate analysis

Table presenting statistical factors emerging from the multivariate analysis in the whole cohort of patients (n=89). Abbreviations: HR; Hazard ratio, M; Metastasis.

Supplementary Table 3: Clinical parameters of the Ovarian cancer patient's cohort.

Clinical data of patient analyzed in **Fig. 1E-H** (n=51). Table presenting patients partitioned into netrin-1 high, low and negative groups according to clinical data. Tumor is graded by FIGO stage. The lower table presents the mean Allred scores of netrin-1 according to the platinum response or CA125 circulating level after treatment.

Supplementary Table 4: Cytokine profiling by multiplex array of EMT6 tumor bearing mice after treatment or not by vehicle, anti-CTLA4, anti-netrin-1 or combination.

Supplementary Figure 1: Association of netrin-1 expressions with CSC in human breast and ovarian cancers.

A. Netrin-1 mRNA expression level within tumors segmented by ABCC1, CXCR4, Bmi1 or PROCR mRNA expression (n=69). High and Low have been determined respectively by the upper and lower values separated by the median of mRNA expression measured by q-RT-PCR. Bars are mean values +/- s.e.m. **B.** Representative netrin-1 immunohistochemistry analysis of high-grade ovarian carcinoma patients. Scale bar (represented by a line): 10µm on the 4x zoomed area (bottom right square). **C.** Boxplot presenting Allred score of netrin-1 IHC in patients with High (n=6) vs Low (n=42) levels of circulating CA125 marker. In all the panel statistics are presented as * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

Supplementary Figure 2: Netrin-1 expression is associated with CSCs markers in PDX model and the cell lines.

A. Cell viability was measured by WST1 assay in netrin-1 positive human breast cancer cell lines (T47D, BT474, HCC1937, HCC70, MDAMB468, Hs578t and SKBR7) treated 48h with adriamycin at 1 µM. The % of cell survival is compared with untreated cultures (n=3). **B-C.** CD44 and CD49f mRNA expression levels were measured by q-RT-PCR in Hs578t (**B**) or SKBR7 (**C**) cell lines treated 48h with 1µM Adriamycin (n=3). Bars are mean values +/- s.e.m., normalized to controls. **D.** Phase contrast pictures of typical mammospheres formation from BT474 and Hs578t breast cancer cells after 7 days of culture (P0) and after one passage in culture (P1). **GE.** CD49f and CD44 mRNA expression levels were measured by q-RT-PCR in Hs578t (n=4 vs 5) and OV90 (n=6 vs 3) cell lines comparing standard 2D culture and

mammosphere 3D. Bars are mean values +/- s.e.m., normalized with the control 2D group. **F.** Quantification of CD49f and CD44 by q-RT-PCR respectively in CD49f^{low} and CD49f^{high} Hs578t (n=4) sorted breast cell population and in CD44^{low} and CD44^{high} OV90 (n=6 vs 3) (Bars are mean values +/- s.e.m.). **G.** Quantification of ALDH1^{high} population in SKBR7 cell line (left). Bars are mean values +/- s.e.m. Netrin-1, ALDH1A1, ALDH1A3 and CD44 mRNA expression levels were measured by q-RT-PCR in ALDH1^{high} and ^{low} populations sorted from SKBR7 cell line. Bars are mean values +/- s.e.m., normalized with ALDH1^{low} (n=4). **H.** Netrin-1 and CD44 mRNA expression levels measured by q-RT-PCR in HBC146 tumor cells sorted on CD44 marker. Error Bars indicate values for a pool of 5 untreated tumors, normalized to the CD44 positive group. In all the panel statistics are presented as * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

Supplementary Figure 3: Netrin-1 blockade does not induce tumor growth inhibition in HBC146 and BRE12 PDX models.

A-D, F-G. Tumor volume was respectively measured in the HBC146 (n=10 per group), BRE-012 (n=10 per group), OV21 (n=6 per group) human PDX models [377], OV90 (n=10 per group with CP (**D**), n=8 per group with anti-netrin-1 (**F**) or OVCAR3 (n=5 vs 6 per group) cell lines treated with irrelevant IgG1 or anti-netrin-1 mAb as a monotherapy. **E.** Serial transplantation experiments of OV21 regrafted in NMRI mice (10^6 living cells). Cells were obtained after a dissociation of tumors from mice treated with the control IgG1 or with the anti-netrin-1 mAb. Results are presented as the number of mice free of tumor take with respectively (n=10, 10 and 11 mice per group). **H.** Immunoblot presenting the validation of Unc5B Knock down (left). Full membrane images were included in the supplementary material. Tumor initiating cell efficiency assay of HCC1937 cell line xenografted in NMRI mice (n=12 vs 24) to measure tumor initiation potential (right). In all the panel statistics are presented as * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Supplementary Figure 4: Combination of anti-netrin-1 mAb and anti-CTLA4 mAb modulates immune response in the EMT6 syngeneic model.

A. Immunoblots of netrin-1 on mouse mammary cancer cell lines. Full membrane images were included in the supplementary material. **B.** Tumor growth quantification of syngeneic EMT6 breast mammary carcinoma grafted in BALB/cJ mice treated with vehicle or anti-CTLA-4 mAb. **C.** Spaghetti curves of each animal treated in B, with anti-CTLA-4 mAb, each curve representing a mouse (n=8). **D.** Analysis of T-regulator lymphocytes by flow cytometry infiltrated in tumors treated with PBS or Anti-CTLA-4 mAb. T-regulator lymphocytes are defined as CD45⁺; CD4⁺; CD25⁺; FoxP3⁺ cells (respectively n=12, 12, 12 and 13). **E.** Tumor growth quantification of syngeneic EMT6 mammary carcinoma cell line, in mice treated or not with control IgG1 or with anti-netrin-1 mAb. **F.** IFN γ secretion analysis using ELISA assays. Cytokine levels were measured in peripheral blood 18hours after the 1st, the 2nd or the 3rd anti-CTLA-4 mAb treatment of BALBc/J mice caring EMT6 cell grafts and treated, or not, with anti-netrin-1 mAb or control human IgG1 (n=3). In all the panel statistics are presented as * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$.

Supplementary Figure 5: Nature of CSC in EMT6 tumors

A. Flow cytometry analysis of T-cells cocultured, or not, for 2-days with PMN-MDSCs. **B.** Flow cytometry analysis of INF γ ⁺ released by CD8⁺ cells cocultured, or not, with PMN-MDSCs for 2-days. **C.** Flow cytometry analysis of CD49f⁺ in EMT6 cancer cell line cultured 48h with IgG1 or anti-netrin-1. **D.** Flow cytometry analysis of EMT6 cancer cells obtained after dissociation of

tumors treated with: IgG1, anti-netrin-1 mAb alone or in combination with anti-CTLA-4. CSC markers are defined as CD326^{neg} cells among the CD45^{neg} (CD45⁻) population (respectively n=10, 8, 8 and 10). **E.** Serial transplantation experiments of EMT6 cells as a measurement of cancer stemness potential of CD49f^{+/-} (n=5⁺ vs 10⁻) (left) and CD326^{+/-} (n=8⁺ vs 10⁻) (right) populations. Cells were dissociated from EMT6 untreated tumors from BALBc/J mice and submitted to cell sorting based on CD49f or CD326 expression. 5 x 10⁴ living cells of each positive or negative populations were regrafted in new recipient animals. Results are presented as the number of mice free of tumor. **F.** Flow cytometry analysis of CD49f⁺ in EMT6 cancer cell line cultured 48h with IgG1 or anti-netrin-1, alone or associated with the caspase inhibitor BOC. **G.** Immunoblot presenting the validation of Unc5B Knock down by shRNA in EMT6 cell line (left). Full membrane images were included in the supplementary material. Tumor initiating cells efficiency assay of EMT6 cell line grafted in BalbC mice (n=12) to measure tumor initiation potential (right). In all the panel statistics are presented as * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Whole population								M0 patients							
		Ntn1 Low		Ntn1 High		Total				Ntn1 Low		Ntn1 High		Total	
n		40		49		89		n		33		34		67	
M	n	%	n	%	n	%		M	n	%	n	%	n	%	
-	0	0	0	0	0	0		-	0	0	0	0	0	0	
0	36	90	27	55.1	63	70.8	Chi-2	0	33	100	34	100.0	67	100.0	
1	4	10	12	24.5	16	18.0	0.0216	1	0	0	0	0.0	0	0.0	
N	n		n		n			N	n		n		n		
	40		48		88				33		34		67		
Mean (SD)	4.9	7.3	4.7	5.6	4.8	6.4	T-test	Mean (SD)	3.3	5.4	3.1	3.9	3.2	4.7	T-test
Median	1.5		2		2		0.8659	Median	1		1		1		0.8804
Min-Max	0	24	0	21	0	24		Min-Max	0	24	0	14	14	24	
	n	%	n	%	n	%			n	%	n	%	n	%	
-	0	0	1	2.0	1	1.1		-	0	0	0	0.0	0	0.0	
0	12	30	9	18.4	21	23.6	Chi-2	0	12	36.4	8	23.5	20	29.9	
1-3	15	37.5	20	40.8	35	39.3	0.4599	1-3	14	42.4	15	44.1	29	43.1	Chi-2
>=4	13	32.5	19	38.8	32	36.0		>=4	8	24.2	10	29.4	18	26.9	0.5939
Age	Mean (SD)		Mean (SD)		Mean (SD)			Age	Mean (SD)		Mean (SD)		Mean (SD)		
	51.3	12.5	59.0	10.9	55.5	12.2	T-test		51.2	12.2	59.1	10.7	55.1	12.1	T-test
Median	48.1		60.7		55.4		0.0028	Median	49.9		60.7		55.4		0.0064
Min-Max	28.5	82.7	36.1	83.6	28.5	83.6		Min-Max	28.5	75.4	36.1	74.0	28.5	75.4	0.0064
	n	%	n	%	n	%			n	%	n	%	n	%	
-	0	0	0	0	0	0		-	0	0	0	0	0	0	
<=60	31	77.5	23	46.9	54	60.7	Chi-2	<=60	25	75.8	16	47.1	41	61.2	Chi-2
>60	9	22.5	26	53.1	35	39.3	0.0045	>60	8	24.2	18	52.9	26	38.8	0.0160
SBR	n	%	n	%	n	%		SBR	n	%	n	%	n	%	
-	1	2.5	2	4.1	3	3.4		-	1	3.0	1	2.9	2	3.0	
1	4	10	5	10.2	9	10.1	Chi-2	1	4	12.1	4	11.8	8	11.9	
2	17	42.5	23	46.9	40	44.9	0.8622	2	16	48.5	15	44.1	31	46.3	Chi-2
3	18	45	19	38.8	37	41.6		3	12	36.4	14	41.8	26	38.8	0.9182
ER	n	%	n	%	n	%		ER	n	%	n	%	n	%	
-	1	2.5	2	4.1	3	3.4		-	1	3.0	0	0.0	1	1.5	
0	12	30	10	20.4	22	24.7	Chi-2	0	9	27.3	7	20.6	16	23.9	Chi-2
1	27	67.5	37	75.5	64	71.9	0.3152	1	24	72.7	26	76.5	50	74.6	0.5657
PR	n	%	n	%	n	%		PR	n	%	n	%	n	%	
-	1	2.5	2	4.1	3	3.4		-	1	3.0	0	0.0	1	1.5	
0	11	27.5	14	28.6	25	28.1	Chi-2	0	7	21.2	7	20.6	14	20.9	Chi-2
1	28	70	33	67.3	61	68.5	0.8722	1	26	78.8	26	76.5	52	77.6	1.0000
Her2	n	%	n	%	n	%		Her2	n	%	n	%	n	%	
-	5	12.5	4	8.2	9	10.1		-	5	15.2	1	2.9	6	9.0	
0	29	72.5	35	71.4	64	71.9	Chi-2	0	27	81.9	25	73.5	52	77.6	Chi-2
1	6	15	10	20.4	16	18.0	0.5731	1	2	6.1	7	20.6	9	13.4	0.0995
Hormono	n	%	n	%	n	%		Hormono	n	%	n	%	n	%	
-	0	0	0	0.0	0	0.0		-	0	0	0	0.0	0	0.0	
0	12	30	10	20.4	22	24.7	Chi-2	0	7	21.2	10	29.4	17	25.4	Chi-2
1	28	70	39	79.6	67	75.3	0.2967	1	26	78.8	24	70.6	50	74.6	0.4406
Radiation	n	%	n	%	n	%		Radiation	n	%	n	%	n	%	
-	0	0	0	0.0	0	0.0		-	0	0	0	0.0	0	0.0	
0	4	10	12	24.5	16	18.0	Chi-2	0	4	12.1	2	5.9	6	9.0	Chi-2
1	36	90	37	75.5	73	82.0	0.0766	1	29	87.8	32	94.1	61	91.0	0.3713
Chemo	n	%	n	%	n	%		Chemo	n	%	n	%	n	%	
-	0	0	0	0.0	0	0.0		-	0	0	0	0.0	0	0.0	
0	12	30	14	28.6	26	29.2	Chi-2	0	7	21.2	10	29.4	17	25.4	Chi-2
1	28	70	35	71.4	63	70.8	0.8828	1	26	78.8	24	70.6	50	74.6	0.4406

Supplementary Table 1

	HR (95% CI)	p Value
Metastasis	2.434 (1.103; 3.766)	< 0.001
netrin-1	1.377 (0.227; 2.527)	0.017

Supplementary Table 2

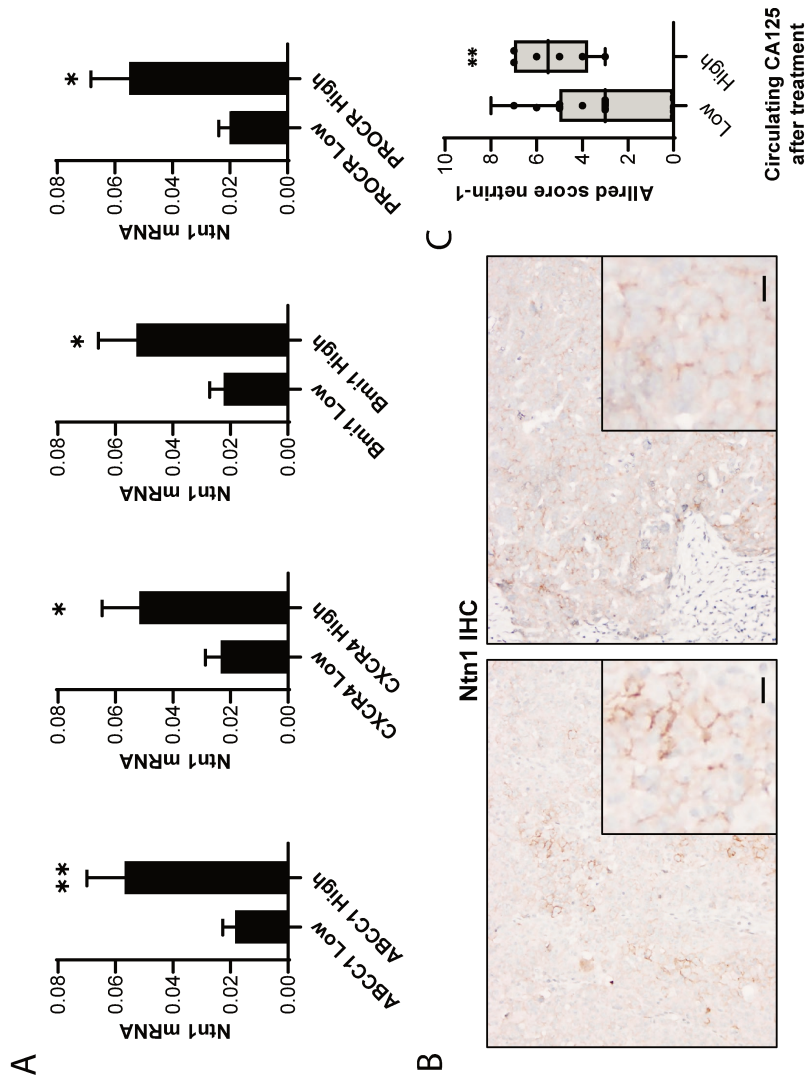
	Ntn1 Neg	Ntn1 Low	Ntn1 High
n	23	18	10

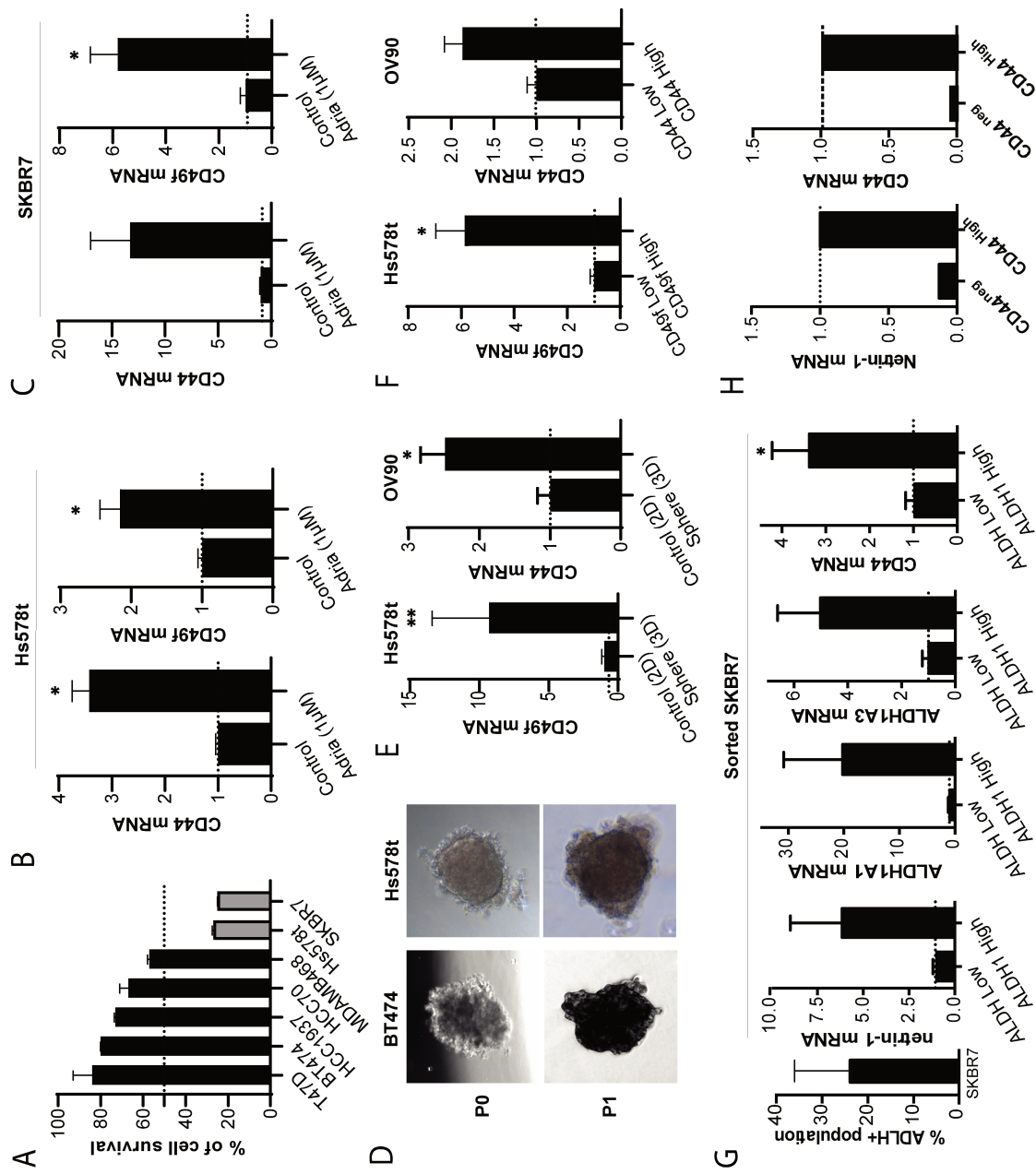
Age (Mean, SD)	64	9.9	64	9.4	65	9.3
----------------	----	-----	----	-----	----	-----

Grade (n, %)						
I	1	4.4	4	22.2	2	20
II	3	13	0	0	0	0
III	19	82.6	12	66.7	8	80
IV	0	0	2	11.1	0	0

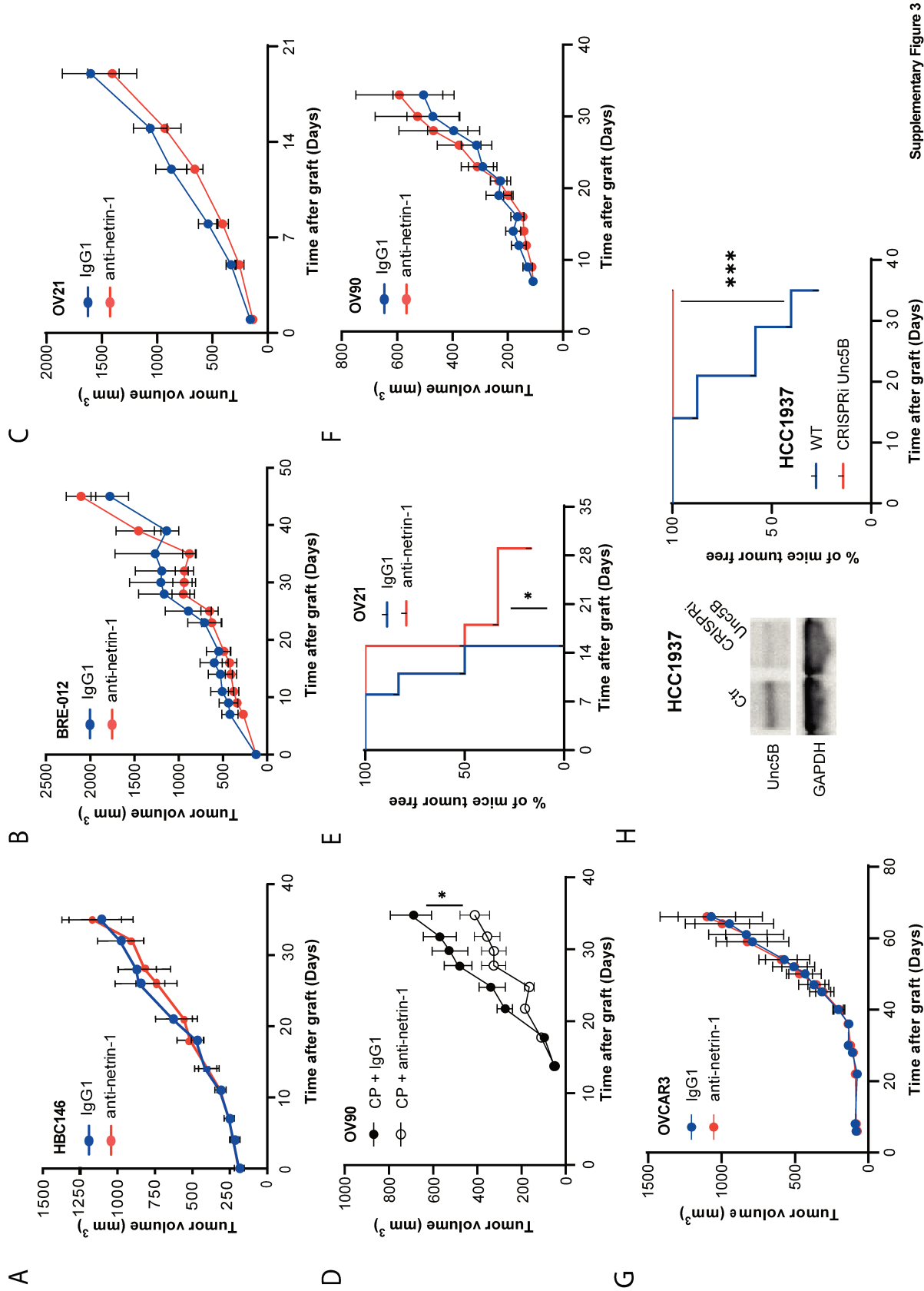
	Responder	Resistant	CA125 Low	CA125 High
(n, %)	17	68	8	32
Ntn1 (Mean, SD)	1.6	2.2	4.8	2.5
			2.5	2.7
			5.3	1.6

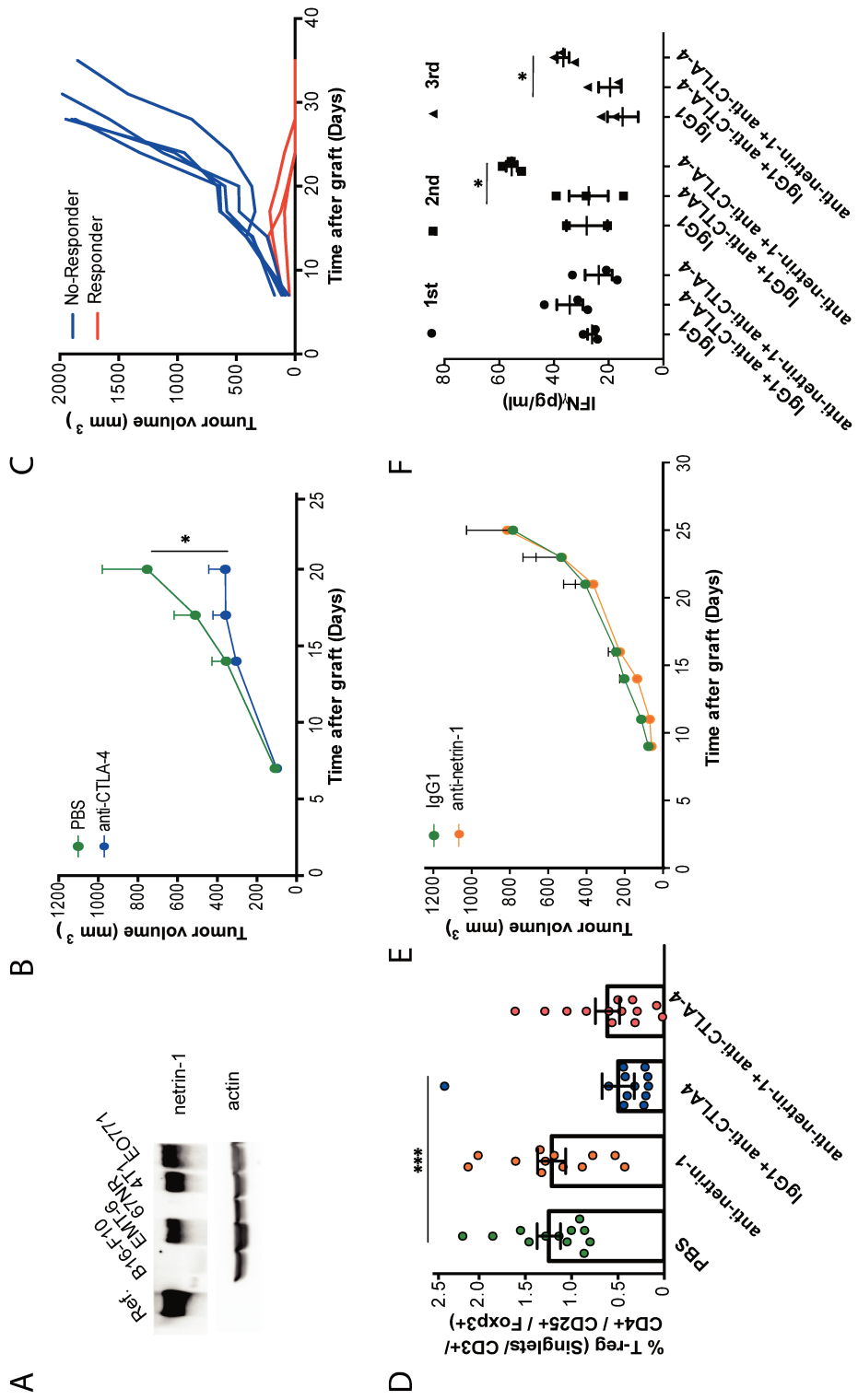
Supplementary Table 3



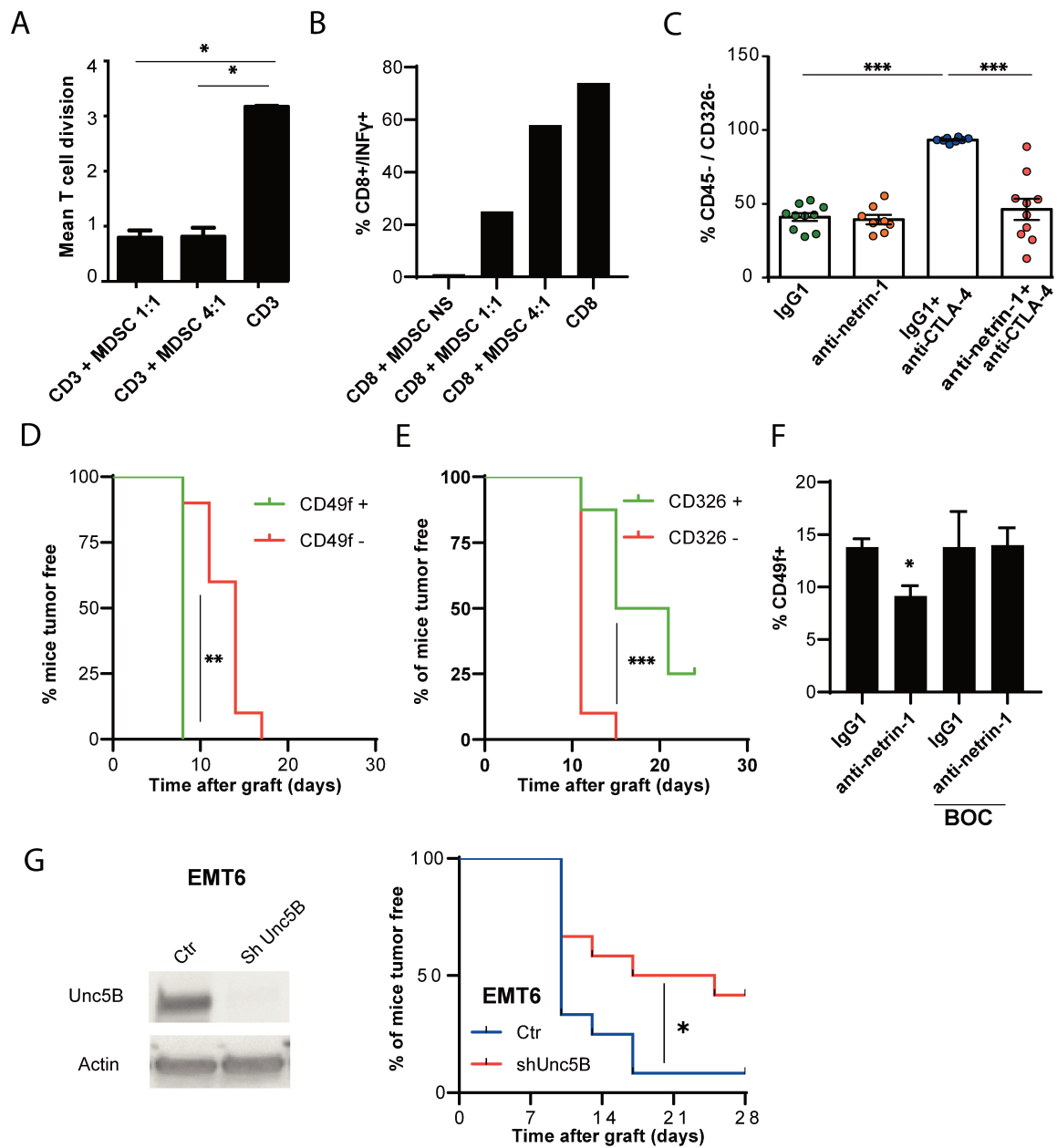


Supplementary Figure 2





Supplementary Figure 4



Supplementary Figure 5

Discussion

Les résultats obtenus à l'issue des travaux présentés ci-dessus montrent pour la première fois un lien entre nétrine-1 et les CSCs dans les tumeurs mammaires et ovariennes. Dans un premier temps, une fonction de marqueur pronostic indépendant pour la progression de ces maladies lui a été découverte grâce à des analyses de cohortes de patientes. Dans un second temps, l'association supposée de nétrine-1 avec les CSCs a été confirmée par plusieurs tests fonctionnels et d'analyse de marqueurs, *in vitro* comme *in vivo* mais également chez l'Homme, ouvrant la porte à un intérêt thérapeutique du NP137 pour cibler spécifiquement les CSCs. Ainsi, le potentiel du NP137 a été investigué dans un troisième temps et des capacités à diminuer la résistance aux chimiothérapies conventionnelles et aux immunothérapies ainsi qu'à retarder la survenue de rechutes ont été mises en évidence. Enfin, un rôle des neutrophiles immunosuppresseurs PMN-MDSCs médié par nétrine-1 dans le maintien des CSCs a également été mis en avant.

L'ensemble de ces résultats a donc permis de montrer une contribution directe mais également indirecte de nétrine-1 au maintien des CSCs dans les tumeurs mammaires et ovariennes ainsi qu'un intérêt du NP137 dans la prise en charge thérapeutique des patients.

Cependant, plusieurs questions émergent notamment en regard des mécanismes impliqués dans la médiation des caractères souches par nétrine-1. En effet, nos travaux ont mis en évidence l'existence d'une voie positive induite par nétrine-1 dans les CSCs mais cette dernière doit encore à être élucidée.

1 Mécanismes d'action

1.1 Des similitudes avec les cellules souches embryonnaires et adultes normales

Comme déjà évoqué précédemment, le rôle de nétrine-1 dans les cellules souches embryonnaires et adultes a déjà été décrit par plusieurs équipes [82], [83], [375]. Cependant, seule une étude préliminaire avait commencé à explorer le rôle de nétrine-1 dans les CSCs [87]. Notre travail démontre donc pour la première fois un lien de nétrine-1 avec les CSCs, cette fois dans les contextes de cancer du sein ou de l'ovaire.

Les rôles de plusieurs récepteurs de nétrine-1 ont été mis en avant pour expliquer les fonctions de nétrine-1. En accord avec ses caractéristiques de ligand des RDs, il a été décrit, en contexte non tumoral, que l'absence de nétrine-1 induit une mort des cellules aux stades précoces de la reprogrammation des iPS via DCC tandis que l'apoptose des cellules souches embryonnaires est médiée par UNC5-B [82]. De façon similaire, nous avons montré que la diminution de la population caractérisée par le marqueur souche CD49f⁺ médiée *in vitro* par le NP137 dans la lignée tumorale mammaire murine EMT6 fait intervenir l'activation de caspases. En effet, l'ajout de l'inhibiteur des caspases BOC entraîne une perte de l'effet du NP137. Face à ce constat, nous spéculons sur une mort par apoptose de ces cellules, médiée par un RD. Des expériences complémentaires sont nécessaires pour identifier de façon certaine la survenue d'apoptose et le RD impliqué.

Cependant, il est également tout à fait envisageable que l'effet du NP137 passe par une perte de l'activation de la voie positive du récepteur de nétrine-1 plutôt qu'une activation de sa voie négative induisant leur mort. En effet, comme nous l'avons vu en introduction, les CSCs ont développé un grand nombre de stratégies afin de développer une résistance à l'apoptose [154]. Ainsi il n'est pas aberrant d'envisager que l'effet du NP137 sur les CSCs passe également par un arrêt du maintien du caractère souche des CSCs résistantes à l'induction de la voie négative du RD. Ces deux hypothèses ne sont d'ailleurs pas incompatibles dans un même modèle compte tenu de l'hétérogénéité tumorale, les différentes sous-populations cellulaires pouvant engager une réponse différente à l'anticorps.

Nous avons identifié UNC5-B comme un candidat prometteur en tant que récepteur de nétrine-1 dans les CSCs. En effet, nous avons montré que son absence diminue significativement les capacités des cellules à initier des tumeurs montrant ainsi qu'UNC5-B joue un rôle dans le maintien des propriétés souches des CSCs.

Les voies positives induites par la fixation de nétrine-1 sont mieux connues que la voie négative et sont donc mieux décrites dans la littérature. Ainsi, Huyghe *et al.* ont décrit que nétrine-1 est essentielle pour maintenir à un état de pluripotence [83]. Les auteurs ont d'ailleurs montré que l'expression ectopique de nétrine-1 empêche la différenciation des mESCs même dans les conditions adéquates. Ce contrôle de l'auto-renouvellement se fait par une inhibition de la voie Mek1-2/Erk1-2 des MAPK, promouvant la croissance et la différenciation cellulaire, et une activation de la voie Wnt, favorisant le maintien des caractères souches. Cet effet de nétrine-1 se fait via ses récepteurs Neo-1 et UNC5-B qui travaillent en collaboration pour maintenir l'état de pluripotence : une altération de l'un ou l'autre de ces récepteurs est suffisante pour entraîner une différenciation des mESCs. De même, Renders et ses collègues ont montré que le maintien de la quiescence et des capacités d'auto-renouvellement des cellules souches hématopoïétiques passe par la fixation de nétrine-1 sur son récepteur Neo-1 [375]. Ainsi, notre hypothèse d'une perte des propriétés souches des CSCs à la suite du traitement au NP137 est cohérente avec la littérature mais nécessite évidemment d'être validée expérimentalement. Dans un premier temps, il est donc nécessaire de vérifier si les mécanismes précédemment présentés et décrits dans des cellules souches saines sont également retrouvés dans les CSCs. Cependant des résultats préliminaires en comparant le niveau d'activation de la voie Wnt (via la modulation de la phosphorylation des protéines Focal Adhesion Kinase et GSK dans des cellules EMT6 triées sur le marqueur CD49f n'ont cependant pas été concluants (résultats non montrés).

Enfin, la méthode de traçage de lignée serait idéale afin de pouvoir définir clairement l'impact du NP137 sur le devenir des CSCs. Cette méthode permet effectivement de suivre le destin d'une cellule et de ces descendants avec un impact minimal sur sa fonction physiologique. Ainsi, nous pourrions identifier une mort des CSCs ou une modification de sa plasticité. Un modèle murin avec un rapporteur pour nétrine-1 vient récemment d'être développé au laboratoire dans ce but.

1.2 Un rôle de nétrine-1 sur les CSCs via une modulation de l'EMT

Le rôle de l'EMT dans le maintien des CSCs est considérablement décrit dans la littérature [378]–[381]. Très récemment, des travaux du laboratoire ont mis en évidence un rôle du NP137 dans l'induction d'une MET à la fois *in vivo* dans un modèle murin de carcinome squameux mais également chez l'Homme i.e. chez les patientes atteintes de cancer de l'endomètre incluses dans l'essai clinique de phase I du NP137 [99], [100].

En effet, après traitement au NP137, les tumeurs deviennent plus épithéliales ce qui renforce l'hypothèse d'une perte des propriétés souches des CSCs en l'absence de nétrine-1. La modulation des facteurs de transcriptions de l'EMT comme ZEB1, TWIST ou encore Snail régule également l'état souche des CSCs [378]–[380]. Ainsi, il serait intéressant d'étudier la variation des facteurs de transcription de l'EMT au sein des CSCs au cours d'un traitement au NP137. Également, un rôle de la voie PTEN/PI3K/Akt dans la réversion de l'EMT a été mis en lumière au laboratoire. L'étude de cette voie dans les CSCs serait également intéressante pour comprendre le mécanisme d'action du NP137 sur les CSCs.

Une réversion de l'EMT représente également un rôle non-négligeable pour une limitation de la propagation de la maladie via le développement de métastases. En effet, l'activation du programme d'EMT semble crucial pour la dissémination des cellules cancéreuses et il a été montré que ce programme s'active préférentiellement au niveau du front d'invasion des tumeurs permettant ainsi aux cellules cancéreuses de migrer [373]. Des données déjà acquises au laboratoire ont mis en évidence que les cancers du sein métastatiques expriment un haut niveau de nétrine-1 en comparaison aux tumeurs non-métastatiques [123].

Le rôle du NP137 dans la limitation de la diffusion métastatique n'a cependant pas pu être investigué au cours de notre étude. En effet, bien que le modèle de PDX HBC-146 majoritairement utilisé dans notre projet provient d'un cancer du sein triple négatif, des cancers connus pour leur grand potentiel métastatique, aucun processus de dissémination n'a pu être mis en avant dans nos expériences [382]. En effet, la tumeur primitive pousse trop vite et ne laisse pas suffisamment de temps pour que l'animal ne développe des métastases. De même, le modèle des EMT6 a été choisi en raison de son expression de nétrine-1 et de sa réponse partielle à l'immunothérapie et non pour d'éventuelles capacités métastatiques. Ainsi, il sera nécessaire d'utiliser un nouveau modèle pour investiguer le rôle de nétrine-1 dans la dissémination. Pour cela, la lignée cellulaire murine 4T1 semble idéale, cette dernière ayant été décrite comme hautement métastatique et exprime très fortement nétrine-1 contrairement à son homologue 67NR issu de la même tumeur qui ne métastase pas et n'exprime pas nétrine-1 [383].

1.3 Un rôle de nétrine-1 via la modulation du microenvironnement

Comme décrit dans notre article, nétrine-1 possède également un rôle indirect sur les CSCs via une modulation du microenvironnement tumoral passant par des cellules immunosuppressives myéloïdes identifiées comme les PMN-MDSCs. En effet, il semblerait que les PMN-MDSCs soutiennent le caractère souche des cellules tumorales via la production de nétrine-1 par ces dernières. Le mécanisme d'action reste à découvrir mais cette observation permet d'envisager de combiner le NP137 avec les immunothérapies. D'autres travaux au laboratoire ont montré un crosstalk entre les CAFs et les cellules souches tumorales [135]. Les CAFs assurant un rôle de soutien et de production de nétrine-1, nous n'avons que peu ou pas observé de production stromale de nétrine-1 dans les indications gynécologiques qui ont fait l'objet de notre étude. En revanche, ces travaux suggèrent une régulation dépendante de l'IL-6. Il serait intéressant de voir si cette cytokine pouvait participer au contrôle des CSCs par les PMN-MDSC.

2. Enjeux thérapeutiques

2.1 L'expression de nétrine-1 comme facteur pronostic : et alors ?

Un facteur pronostic désigne des données quantitatives fournissant des informations sur l'issue attendue d'une maladie spécifique indépendamment du traitement que le patient va recevoir [384]. Il existe plusieurs raisons pour laquelle la détermination de tels facteurs est importante. Parmi ces raisons, on trouve notamment un intérêt pour l'optimisation de la stratégie thérapeutique [385]. En effet, si on prend par exemple les cancers mammaires, l'invasion des ganglions est un facteur pronostic communément utilisé pour décider de l'utilisation d'un traitement systémique ou non [386]. Cependant, certaines patientes ne présentant pas d'invasion ganglionnaire pourraient tirer un bénéfice d'un traitement systémique tandis que d'autres présentant cette invasion n'en tirent que peu de résultats.

De nouveaux facteurs pronostics sont donc nécessaires afin de traiter au mieux les patients. Trois rôles de ces facteurs ont donc été décrits [387] : identifier les personnes avec un bon pronostic pour qui un traitement systémique ne possède pas une balance bénéfique clinique/risque favorable, identifier les patients avec un pronostic assez mauvais pour justifier l'utilisation d'une thérapie adjuvante agressive et enfin de sélectionner les patients dont les tumeurs sont plus ou moins susceptibles de tirer un bénéfice d'une thérapie particulière.

L'identification de nétrine-1 comme facteur pronostic dans les cancers mammaires et ovariens s'intègre donc parfaitement dans les besoins actuels de la recherche clinique. Cette découverte offre la possibilité d'une meilleure identification des patientes présentant un risque de rechute plus élevé et pouvant tirer un bénéfice d'une thérapie plus agressive.

Cependant, il est important de tenir compte des différents sous types de cancers. En effet, les cancers du sein mais également de l'ovaire sont des pathologies divisées en plusieurs sous-types. Ainsi, quatre sous-types de cancers du sein sont globalement reconnus : luminal A, luminal B, positif au récepteur hormonal HER2 et triple négatif [388]. De même, les carcinomes ovariens sont répartis en cinq sous-types : séreux de haut-grade, séreux de bas-grade, à cellules claires, endométrioïde et mucineux [389]. Ainsi, il serait intéressant de pouvoir stratifier les patients afin de regarder si la valeur pronostique de nétrine-1 est associée à un sous-type en particulier.

En ce qui concerne les différents sous-types de cancer du sein, le rôle de nétrine-1 comme facteur pronostic dans les cancers de type Luminal-A a été vérifié comme montré sur la **Figure 41** ci-dessous. Cependant, suite à un nombre de patientes trop faible pour les autres sous-types, le rôle de nétrine-1 n'a pas pu y être identifié.

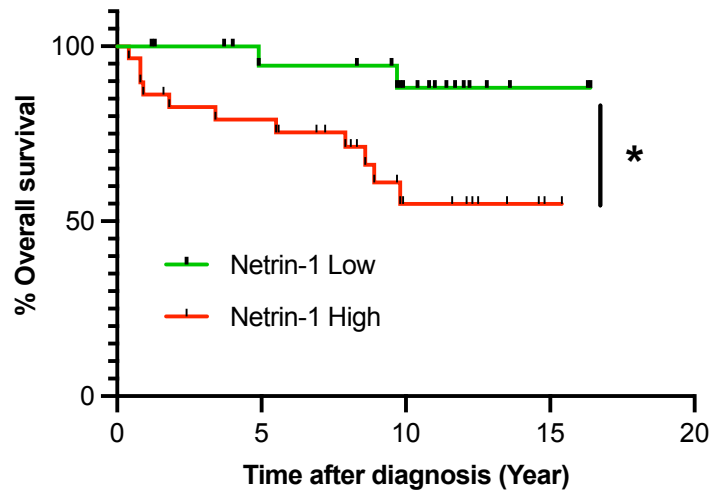


Figure 41 : Rôle pronostic de nétrine-1 dans les cancers du sein de type luminal A

Courbes Kaplan-Meier montrant la probabilité de survie au cours du temps en fonction du niveau d'expression de nétrine-1 chez 52 patientes atteintes de carcinome mammaire de type luminal A. (Test Log-rank ; $p=0.0161$)

Dans le cas des cancers de l'ovaire, l'association de nétrine-1 avec le marqueur souche CD44 n'a été observé que dans les cas des carcinomes de haut-grade, ainsi l'analyse du rôle pronostic de nétrine-1 n'a été faite que dans cette indication. De plus, dans le cadre de ce sous-type de cancer ovarien, il est à noter que nétrine-1 est associée à une résistance aux sels de platine. Ces données rétrospectives confèrent un positionnement plus clair dans la sélection des patientes pour d'éventuels essais cliniques.

2.2 Ouverture à d'autres cancers

Dans notre étude, nous nous sommes limités aux CSCs du sein et de l'ovaire. Cependant, comme déjà mentionné, une association de nétrine-1 avec les CSCs de glioblastome a également été décrite dans des résultats préliminaires [87]. Cela suggère que le potentiel thérapeutique du NP137 à cibler les CSCs puisse être étendu à d'autres indications. En effet, les CSCs ont été décrites dans un grand nombre de tumeurs allant du poumon au foie en passant par l'estomac ou encore le colon [390]. Il serait donc intéressant d'explorer l'association de nétrine-1 avec les CSCs dans la plupart des cancers afin d'éventuellement étendre le potentiel thérapeutique du NP137 à plus de patients.

Exemple 2 : Nétrine-1 dans les synovialosarcomes :
rôles, régulation et potentiel thérapeutique

Rationnel et objectif du projet de recherche

Comme déjà présenté plus tôt dans ce manuscrit, des données précliniques mais également les résultats cliniques chez l'Homme ont mis en avant une capacité de l'anticorps thérapeutique anti-nétrine-1, le NP137 non seulement à induire la mort des cellules tumorales exprimant nétrine-1 mais également à induire une épithélialisation des tumeurs.

Les sarcomes sont des tumeurs biologiquement et cliniquement hétérogènes se développant à partir des tissus du mésenchyme ou de l'ectoderme. Certains sous-types tumoraux présentent des caractéristiques de plasticité cellulaire. C'est notamment le cas de certains adénosarcomes et synoviosarcomes dans lesquels on peut trouver des contingents cellulaires présentant un phénotype épithélial. La présence de ces contingents témoigne d'une MET.

Nous avons, suite à ce constat, décidé d'investiguer le potentiel de l'anticorps thérapeutique sur des tissus d'origine mésenchymateuse à savoir dans les sarcomes et plus particulièrement dans les synoviosarcomes dont le pronostic est très sombre et les outils thérapeutiques limités. En effet, il est supposé que, via son action sur la plasticité cellulaire, le NP137 pourra épithélialiser les sarcomes et ainsi les rendre moins agressifs et plus sensible aux thérapies conventionnelles.

Le but de ce projet de recherche a donc été dans un premier temps d'analyser l'expression de nétrine-1 dans une cohorte de patients atteints de SS ainsi que d'apporter des éléments mécanistiques sur la régulation de l'expression de nétrine-1 mais également de son récepteur UNC5-B dans cette pathologie. Enfin, des études précliniques de l'efficacité du NP137 *in vivo* ont également été réalisées.

Résultats

J'ai fait le choix de présenter les résultats obtenus à ce jour sous la forme d'une publication scientifique. Son contenu est en cours d'étayage et fera l'objet du projet principal de thèse d'un prochain étudiant. Afin de respecter la présentation « classique » des publications scientifiques, la discussion à la fin de l'article reste articulée autour des résultats préliminaires présentés. Une discussion plus longue présentant entre autres les difficultés rencontrées dans ce projet ainsi que les expériences restant à réaliser est associée à cette partie « Résultats ».

Netrin-1 has a prognosis value in synovial sarcoma and is a potential therapeutic target

Camille Victoor^{1,2}, Nicolas Braissand², Sarah McCollum^{3,4}, David Goldschneider², Armelle Dufresne⁵, Alexandra Meurgey⁵, Benoit Samson², Mohsen Seyedi², David Neves², Anne Bigot⁵, Kevin Jones^{3,4}, Benjamin Ducarouge^{2,5,£}, Agnès Bernet^{1,5,£}, Patrick Mehlen^{1,2,5,£}

¹Apoptosis, Cancer and Development Laboratory- Equipe labellisée 'La Ligue', Labex DEVweCAN, Institut Convergence PLAsCAN, Centre de Cancérologie de Lyon, INSERM U1052-CNRS UMR5286, Université de Lyon, Centre Léon Bérard, 69008 Lyon, France.

²Netris Pharma, Centre Léon Bérard, 69008 Lyon, France.

³Department of Oncological Sciences, University of Utah, Salt Lake City, Utah, USA.

⁴Huntsman Cancer Institute, University of Utah, Salt Lake City, Utah, USA.

⁵Research Pathology Department, Centre Léon Bérard, Lyon, France

⁶ Sorbonne Université, Inserm, Institut de Myologie, Centre de Recherche en Myologie, Paris, France.

⁵Corresponding authors:

P. Mehlen : patrick.mehlen@lyon.unicancer.fr

A. Bernet : agnes.bernet@lyon.unicancer.fr

B. Ducarouge : benjaminducarouge@netrispharma.com

[£]Co-senior authors

Abstract

Overexpression of netrin-1 has been observed in several types of cancers but never investigated in sarcomas. Here we showed that netrin-1 is overexpressed in the synovial sarcoma subtype where it is also found as a poor prognosis marker. Our efforts to understand its regulation have come to the conclusion that the pathognomonic fusion protein SS18-SSX plays a key role in netrin-1 expression, probably through epigenetics events retargeting BAF complex on netrin-1 locus and promoting PRC2 eviction. We also showed that an anti-netrin-1 monoclonal antibody (NP137) significantly reduces tumor growth in an induced genetically engineered mouse model of synovial sarcoma, highlighting netrin-1 as a promising therapeutic target in this disease.

Introduction

Initially described as a guidance cue, netrin-1 is a laminin-related secreted protein emerging as a multifunctional plasticity cue [1]–[3]. It is the prototypic ligand of Dependence Receptors (DR), a functional family of receptors shown to be cleaved and to trigger cell death in a poor ligand environment [4], [5]. Hence, these receptors exhibit a dual signaling depending on the cellular context. When bound to their respective ligand, DRs dimerize and induce a positive signaling promoting cell survival but also the activation of the ligand's canonical pathway. However, when unbound to their ligand, receptor's monomers undergo caspase cleavage which triggers cell death through an apoptosis cleavage [6]. Main DRs for netrin-1 include Deleted in Colorectal Cancer (DCC), neogenin-1 and the UNCoordinated5 (UNC5) family of receptors.

Overexpression of netrin-1 has been described in various types of cancers [7]–[13] in which it promotes cell survival through its binding to DRs. Considering its oncogenic activity, strategies inhibiting netrin-1/DRs binding showed therapeutic potential as it promotes apoptosis of cancer cells and tumors regression [12]–[15]. On this basis, NP137, a humanized monoclonal antibody, targeting netrin-1 and preventing its binding to its receptors was developed [16]. After completing a Phase I clinical trial and showing no toxicity, NP137 efficacy is currently investigated in other Phase Ib/II clinical trials on diverse indications.

Human Synovial Sarcomas (SS) account for 8% - 10% of all Soft Tissue Sarcomas (STS) and most commonly develop in the lower extremities of young adults [17]. Nearly 100% of tumors contain the pathognomonic t(X;18)(p11.2;q11.2) chromosome translocation that fuses the SS18 gene on chromosome 18 to one of the three closely related genes SSX1, SSX2 or SSX4 on the X chromosome. This fusion produces the hallmark SS18-SSX oncogene in which the 8 C-terminal amino acids of SS18 are replaced with the 78 amino acids from the C-terminal end of SSX [18]–[20].

SS18-SSX lacks DNA binding motifs and appears to be acting through transcriptional regulatory mechanisms. Indeed, SS18 is a subunit of the BRM/BRG Associated Factor (BAF) complex involved in the remodeling of the chromatin and the fusion retains the ability to stably incorporate in BAF [21], [22]. SS18-SSX incorporation retargets BAF complexes on polycomb (PcG)-repressed domains and activate bivalent genes which induce an activation of neural and embryonic pathways that promote cell-cycle regulation and proliferation in SS [23]. Indeed, the balance between activation and repression is achieved in part through BAF complexes opposing PcG-mediated repression. Recent studies have shown that PcG

Repressive Complexes (PRC) and their associated histones marks are rapidly evicted upon BAF recruitment [24]. Moreover, PRC2 loss has also been shown to specifically activate genes with bivalent promoters [25], [26].

Here we sought to investigate the role and regulation of netrin-1 in SS as well as the therapeutic potential of NP137.

Results

Netrin-1 and UNC5-B have a high expression in synovial sarcoma

Sarcomas are a group of cancers that develop from mesenchymal tissues or ectoderm and therefore are mesenchymal tumors. These mesenchymal features are particularly associated with a high metastasis potential and resistance to conventional therapies. As we recently described that netrin-1 deprivation can induce tumor epithelialization [27], [28], we hypothesized that an anti-netrin-1 antibody (NP137) would be able to epithelialize these tumors and therefore decrease their aggressivity as long as their therapeutic resistance.

As sarcomas are a large family of tumors, we first took advantage of the database from the anapathology platform of the Centre Léon Bérard (CLB) (Lyon, France) in order to identify sarcoma subtypes that have a high expression of netrin-1. Netrin-1 spectrum of expression among these tumors is broad and by looking at the tumors having the highest netrin-1 expression, we identified SS as tumors of interest for our study (**Figure 1A**). Indeed, in addition of having a high expression of netrin-1, cellular plasticity among SS have been described in the literature with the biphasic subtype in which mesenchymal cells are associated with epithelial glandular component [29]. Moreover, as netrin-1 impact on cellular plasticity has been described as passing through its receptor UNC5-B, we also confirmed that UNC5-B is well expressed in SS (**Figure 1B**). We then focused on SS with the work of Jerby-Arnon and colleagues, who recently published single cell RNA sequencing (scRNAseq) data from 10 human synovial sarcoma tumors [30]. Using their data, we validated the high expression of netrin-1 and UNC5-B in the cancer cell compartment of all the patients and confirmed the value of further investigations about netrin-1 in SS (**Figure 1C**). Interestingly, netrin-1 and UNC5-B were not specifically associated with the mesenchymal or epithelial component in the biphasic tumors (data not shown). All together, these results confirm interest in netrin-1 in this particular subtype of sarcoma.

Netrin-1 expression is associated with clinical prognosis in synovial sarcoma

In order to analyze the prognosis value of netrin-1 on overall survival (OS) in SS, we used a retrospective clinico-biological cohort from the NetSARC database of the French Sarcoma Group constituted with patients affected with metastatic SS. To evaluate the impact of netrin-1 on prognosis, we analyzed netrin-1 tumor expression using immunohistochemistry (IHC) across a panel of 83 primary tumors, matching expression data with clinical data.

Among patients, 40 were women (48%) and 43 were men (52%) with an average age at diagnosis of $45,14 \pm 13,99$ (range: 19-82) years. The predominant subtype is the monophasic one which represents 67% of the cohort patients. For a subset of patients (n=33), the nature of the fusion protein, SS18-SSX1 or SS18-SSX2, was obtained from RNA-sequencing analysis. However, the nature of the fusion SS18-SSX status didn't show any correlation with

OS (**Supplementary Figure 1 A**). By looking at the 5-year OS, we showed that netrin-1 is associated with a poorer prognosis in SS with a median OS of 2.45 year for patients expressing netrin-1 versus 4.43 years for netrin-1 negative patients (**Figure 2A**). However, it is not correlated with metastasis occurrence (**Figure 2B**). Again, no association between netrin-1 and SS18-SSX status nor with the histotype of the tumor was observed, suggesting that netrin-1 is associated with any fusion protein (**Supplementary Figure 1 B, C**).

Netrin-1 and UNC5-B expression are modulated by SS18-SSX through epigenetic modulations

As the main abnormality in SS is the presence of the fusion protein SS18-SSX, we hypothesized that this fusion produces a protein that could potentially activate netrin-1 expression in SS together with oncogenesis. First, we looked at netrin-1 expression in different SS cell lines and showed that netrin-1 is strongly expressed in 3 out of 4 cell lines of SS along with its receptor UNC5-B (**Figures 3 A,B**). Coherently, the SW982 cell line, which is described as SS cells but lacking the fusion protein [31], doesn't express netrin-1 or UNC5-B (**Figure 3B, Supplementary Figure 1 D**). However, we noted that Yamato cells, which are positive for SS18-SSX expression (**Supplementary Figure 1 D**), also don't express netrin-1. Interestingly, by looking at netrin-1 positive patients at a transcriptomic level, using visium analysis, and protein level, using IHC, we saw a heterogeneity in netrin-1 expression in the tumor, suggesting that all tumor cells do not express netrin-1 (**Figure 3C**). These results suggest a more complex regulation than expected but still support a key role of SS18-SSX in netrin-1 expression.

To go further in the validation of our hypothesis we expressed the fusion protein in non-SS cell lines. As some evidence in the literature are in favor of a muscular origin for SS [32], we therefore decided to use the immortalized healthy human myoblasts cell line AB1167 as recipient cells for the fusion [33]. Moreover, as in most healthy adult tissues, netrin-1 was not expressed in this cell line. For a diversification of models, we also used netrin-1 negative murine myoblasts C2C12, the SS SW982 cell line without translocation and netrin-1 negative lung tumoral cell line A549. Upon transformation with SS18-SSX we showed that netrin-1 expression is induced in all the different cell lines as well as its receptor UNC5-B (**Figure 3D**). The same results were obtained by analyzing Cigall Kadoch's transcriptional results data online after expression of the SS18-SSX protein in CRL7250 human fibroblasts [23] (**Figure 3F**). Interestingly, another human myoblast cell line, AB1079, failed to induce netrin-1 expression upon SS18-SSX ectopic expression (data not shown). Therefore, it sustains our hypothesis about a more complex regulation of netrin-1 as previously shown in some human tumors showing an heterogeneous expression or no expression of netrin-1.

As Chromatin Immunoprecipitation Sequencing (ChIP-seq) results were also available on the CRL7250 fibroblast cell line to study changes in BAF and PRC2 locations on the genome, we then look at the changes of these complexes at the netrin-1 and UNC5B loci after introduction of the fusion protein. As shown in **Figure 3E**, SS18-SSX induces both a relocation of BAF complex on netrin-1 and UNC5-B promoters and a diminution of PRC2 binding at these loci, in line with the eviction of PRC2.

In order to demonstrate that the normal silencing of netrin-1 is due to PRC2 in adult healthy tissues, we tested whether the inhibition of PRC2 complex induces netrin-1 expression in the immortalized naïve AB1167 myoblasts. To do so, we treated cells with EPZ005687 (EZH2i), a compound which is known to inhibit the enzymatic activity of EZH2 without

degrading the protein, thereby reducing H3K27 trimethylation but not EZH2 levels (**Supplementary Figure 1E**). Inhibition of PRC2 function induces the expression of netrin-1 indicating that PRC2 inhibits netrin-1 gene (at least in this cell line) (**Figure 3G**). As expected, netrin-1 expression is barely not affected by EZH2i in the Syo-1 cell line, probably because SS18-SSX already evicted PRC2 from netrin-1 gene.

All together, these data showed an induction of netrin-1 expression due to modifications of the epigenetic landscape initiated by SS18-SSX probably by PRC2 eviction by the incorporation of the fusion SS18-SSX protein into the BAF complex, but this needs to be demonstrated in our cell line, as well as histone modifications associated with changes in netrin-1 transcription. Indeed, in order to confirm the transcriptional activation of netrin-1, we have to show the release of the repressive H3K27me3 and the increase of active H3K4me3 histone marks at the netrin-1 locus.

Netrin-1 activation upon SS18-SSX expression induces cellular plasticity

Interestingly, we noticed a change in the cell morphology of AB1167 upon fusion protein infection and selection. Indeed, cells became rounder evoking the poorly differentiated histotype of SS (**Figure 4A**). In a will to identify a cellular transformation and potentially stemness due to SS18-SSX fusion oncoprotein, we performed some spheroids assay. We showed that SS18-SSX significantly increased the ability of AB1167 cells to form clonogenic spheres in suspension indicating stem cell like features (**Figure 4B**) as already reported in SS cell lines. Indeed, Naka and colleagues showed that SS18-SSX is responsible for these morphological and functional characteristics [34] as verified in our hands using HS-SY-II and Syo-1 cells (**Figure 4C**).

As we have just demonstrated recently, in breast and ovarian cancer, that netrin-1 is associated with the stemness of tumor cells, we then hypothesize that the fusion protein, through the activation of netrin-1 confers a plastic state to the recipient cells [35]. To more specifically investigate the role of netrin-1 in SS cellular plasticity, we performed a silencing of the gene in the SS Syo-1 cell line and evaluate the impact on spheroid formation capacities. We showed that, not only the capacity of forming sarcospheres is altered using siRNA-netrin-1 but the same result is obtained after silencing of UNC5B, the main receptor of netrin-1, supporting the important role of netrin-1/UNC5B in stem like traits including the potential to form sphere and probably to generate cellular plasticity (**Figure 4D**).

Based on Naka *et al.* work who described an increased expression of stemness-related genes like Oct3/4, Nanog and Sox2 in SS cell lines when cultivated as spheres, it would be interesting to assess the expression of these markers in our model and to evaluate its evolution upon netrin-1 knockdown. Furthermore, AB1167 control and AB1167 SS18-SSX2 ability to initiate tumor formation should also be investigated to assess that only AB1167 SS18-SSX2 cells have the ability to give rise to a heterogeneous cell population *in vivo* and therefore strengthen our findings on netrin-1 acting in parallel of stem properties. Afterwards, it would be interesting to modulate netrin-1 expression during the engraftment process to see if netrin-1 indeed, induced by the translocation, has a major role in the ability to initiate tumor formation.

Anti-netrin-1 antibody inhibits tumor growth in a genetically engineered mouse model

Due to netrin-1 roles in cancers especially on cell survival, we then investigated the therapeutical potential of an anti-netrin-1 antibody, NP137, that prevents netrin-1 binding to its receptors. In collaboration with the team of Kevin Jones (Huntsman Cancer Institute, USA), we used a model of genetically engineered mouse in which SS18-SSX2 is under the control of the ubiquitarian promotor Rosa26 and which expression is locally induced upon intramuscular injection of CRE recombinase in the limb (**Figure 5A**). Upon expression of the fusion protein, tumors arose and analysis of microarray data showed a significant increase of netrin-1 and UNC5-B expression in the forming tumor compared to the healthy control (**Figure 5B**).

We then investigated the effect of the therapeutic monoclonal anti-netrin-1 antibody (NP137) in this mouse model of SS. We observed a significant decrease in tumor growth in mice treated with NP137 as compared to control mice (**Figure 5C**).

In order to understand the underlying mechanism of NP137 effect on tumor, we planned to do scRNAseq after dissociation of tumor biopsies treated or not with NP137. The results of this analysis should tell us which cell type disappears upon netrin-1 deprivation and whether the remaining tumors cells have become more epithelial as recently shown in human biopsies in endometrial clinical phase I [28].

Since the NP137 treatment has been described to make the tumor more epithelial, we anticipated a combined treatment with doxorubicin as chemotherapy is known to show more efficacy on epithelial cells. Our preliminary results were unfortunately not conclusive as Doxorubicin as no effect alone and as a consequence, doesn't synergize with the effect of the antibody (**Supplementary Figure 1 F**). We are currently investigating the effect of the combination of NP137 with another chemotherapy classically used in SS known to have an effect on this model the Ifosfamide.

Discussion

Through a cohort analysis, and *in vivo* experiments, we identify that netrin-1 overexpression in SS is associated with a bad prognosis value, highlighting netrin-1 as a potential therapeutic marker and as a new target in this disease. However, additional analyses have to be performed in order to decipher whether netrin-1 could define a specific molecular sub-class of SS and how netrin-1 positive cells participates to tumor progression. Interestingly, even if netrin-1 expression is associated with a bad survival, we could not find any correlation with metastasis activity.

Although overexpression of netrin-1 has already been reported in several types of cancer, no clear explanation for the mechanism of this transcriptional event has been reported to date, apart from the fact that p53 and NF- κ B transcription factors could be involved [36], [37]. We propose here, for the first time, that the pathognomonic protein SS18-SSX could be responsible for the transcriptional induction of netrin-1, normally silenced during development. Indeed, the fusion protein could induce an epigenetic disorder due to a relocation of BAF complexes and the eviction of PRC2 on netrin-1 and UNC5-B loci which allow their overexpression associated with transformation [24].

Modulation of genes expression by SS18-SSX has already been described in the literature in SS. Indeed it has been shown that SS18-SSX can repress gene expression by

enhancing PRC2 activity [38] or, alternatively activate genes expression by evicting PRC complexes and repressive marks [39]. Also, definition of the transcriptional features unique to SS showed an upregulation of genes involve in neural development and embryogenesis in general which fits with netrin-1 and UNC5-B ontology [23]. Our data showed that netrin-1 and UNC5-B expression in SS are dependent of SS18-SSX expression both *in vitro* and *in vivo*. However, due to the long delay between cell infection and our analysis, it is possible that netrin-1 induction is not directly modulated by SS18-SSX-containing BAF complexes. We also showed that netrin-1 expression is modulated by PRC2 however it is still unclear for UNC5-B. However, it seems that the modified BAF complex generated by the fusion bound DNA at netrin-1 and UNC5-B loci, but this must be verified and quantified in our model as well as the opening of chromatin at these locations associated with the presence of RNA polymerase II. SS18-SSX expression probably does not induce netrin-1 expression in all cases as illustrated by the Yamato cell line and as netrin-1 is not found homogeneously in SS human tumors. These results suggest that mechanisms involved in netrin-1 regulation by SS18-SSX are complex and need to be further investigated specially as most of the modification are epigenetic as SS have been described to bear a low mutational burden [23], [40], [41].

Consistently with the literature, netrin-1 and UNC5-B seems to promote cellular plasticity as observed during sphere formation. Netrin-1 has recently been described as a modulator of cellular plasticity in gynecologic cancers [27], [28], [35] and our results in SS on sphere formation is one more example of this property in SS. Targeting netrin-1 is therefore very interesting as it would affect “plastic”-cells which are at the origin of metastasis development and conventional therapy recurrences. This impact on plasticity will be strengthened with further *in vitro* experiments including NP137 treatment of cells to impair their ability to form sarcosphere but also *in vivo* experiments with xenograft of the AB1167 model with or without treatment as already mentioned.

We therefore tested the anti-netrin-1 antibody therapy in a transgenic murine model of spontaneous SS very close to the human pathology and were able to observe a significant regression of the tumor growth while chemotherapy has no effect. As netrin-1 is a ligand of DRs it is more likely that this significant regression is due to the bulk tumor cell death, and this as to be verified by doing cell death tests on tumors.

To summarize, our work described a role of netrin-1 in the development and maintenance of SS by modulating cellular plasticity through its binding to its receptor UNC5-B. Consistently with the literature, its upregulation seems to be the consequence of epigenetics disorders induced by SS18-SSX. Our anti-netrin-1 antibody NP137 is a promising therapy in SS treatment but the potentization of its effect by combining with other compounds should be further investigated.

To go further netrin-1 role and NP137 therapeutic effect should be investigated in other sarcomas, including the Bcl-6 Corepressor (BCOR) rearranged ones in which data showed a high expression of netrin-1. Interestingly the BCOR protein is part of the ncPRC1.1 complex that have been described to interact with SS18-SSX and induced gene activation in SS [42]. Moreover, some recent data (unpublished) also highlighted a role of netrin-1 in pleomorphic sarcoma which also needs further investigations.

Material & Methods

“Sarcoma” cohort

Patients with a diagnosis of sarcoma confirmed by a central histological review based the World Health Organization (WHO) Classification of Tumors for whom tumor samples have been analyzed within the anapathology platform of the Centre Léon Bérard (CLB) (Lyon, France). The database of the anapathology platform was interrogated in June 2023 and

“Synovial Sarcoma” cohort

Study design

This was a retrospective clinico-biological cohort study in which data were obtained from the NetSARC database of the French Sarcoma Group. The study included patients with metastatic SS and available formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) archival primary tumor samples. The patients were diagnosed and managed in national reference centers [Centre Léon Bérard (CLB), Lyon; Institut Bergonié, Bordeaux; and Institut Gustave Roussy, Villejuif], as well as 23 secondary carecenters, across France. Patient information and tumor characteristics were collected from the NetSARC database, and data from any missing fields and updates were collected from patient electronic medical records from visiting treatment centers.

Patients

Adult patients with a histologically confirmed diagnosis of metastatic SS diagnosed since 2000 were included. Patients must have had a representative FFPE archival tumor sample of primary tumor with a corresponding pathological report. CLB certified that patients included in this study did not oppose to the re-use of their data, and this study followed all the processing steps with regard to General Data Protection Regulation (GDPR) and French regulations, including declaration of the data processing by the project coordinator, simplified risk analysis by the data protection officer, registration in the GDPR directory of the institution, establishment of patient information modalities, and declaration of the data processing on the French Data Transparency Portal for patients. The study has been validated by the CLB executive committee on December 3, 2019, under reference R201-004-012.

Tissue collection, biomarker detection, and validation

Patients with metastatic SS were identified from the French Sarcoma database. Available FFPE primary tumor samples were collected by the Biological Resources Center of CLB (“BioBanking Platform”). The biopathology department (sarcoma expert pathologist from the “Reseau de Relecture en Pathologie des Sarcomes” [RRePS] network) of CLB reviewed each case to confirm the pathological diagnosis and assessed the quality and quantity of tumor samples.

Immunohistochemistry

Immunohistochemistry analysis was performed on 4- μ m-thick sections of paraffin embedded mouse tissues stained with anti-netrin-1 (ab126729, Abcam) dilution 1/500. Expressions are revealed by brown DAB staining. Nuclei are counterstained by hematoxylin (blue). Netrin-1 Allred score was assessed by anapathologists.

Publicly available data

Single-cell RNA sequencing visualization

Processed scRNA-seq data from human tumors were visualized using the Single Cell Portal at https://singlecell.broadinstitute.org/single_cell/study/SCP167/synovial-sarcoma?#study-visualize. These data were obtained and processed by Jerby-Arnon *et al.* [30].

Netrin-1 expression analysis

Netrin-1 expression level in synovial sarcoma cell line upon fusion knockdown and in CRL7250 upon addition of the fusion was analyzed based on data from McBride *et al.* [23]. They were accessible on the GEO Accession viewer under the reference GSE108028

ChIP-Seq visualization

ChIP-Seq data were accessible on the GEO Accession viewer under the reference GSE108028 and were provided by McBride *et al.* [23]. Data were visualized using the software IGV.

Cell lines

HS-SY-II, Aska, Yamato and C2C12 cells were obtained from the Riken BRC through the National BioResource Project of the MEXT, Japan. Syo-1 cell line was kindly provided by Dr FUJIWARA Tomohiro from the Department of Orthopaedic Surgery of Okayama University Hospital. AB1167 and AB1079 cell lines were shared with us by the MyoLine platform from Institut Neuromyogène. SW982 and A549 cell line was obtained from ATCC. Aska and Yamato were culture in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) High Glucose complemented with 20% of Foetal Bovine Serum (FBS, Gibco) and Penicilin/Streptomycin (P/S) (Gibco). HS-SY-II and C2C12 were cultured in DMEM Low Glucose + 10% FBS + P/S. Syo-1 were cultured in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) + 10% FBS + P/S. AB1167 and AB1079 were cultured in a homemade medium composed with Medium 199 and DMEM in a 1:4 ratio. This mix is supplemented with 20% FBS, Gentamycin, Fetuin (25µg/mL), human Epidermal Growth Factor (hEGF; 5ng/mL), basic Fibroblast Growth Factor (bFGF; 0,5ng/mL), insulin (5µg/mL), and dexamethasone (0,2µg/mL). Cells were maintained in culture at 37°C under humidified atmosphere consisting of 20% O₂ and 5% CO₂.

Stable SS18-SSX gene expression

SS18-SSX cDNA was obtained by carrying out RT-PCR on RNA from human synovial sarcoma cell lines (Aska for SS18-SSX1 and Syo-1 for SS18-SSX2) using the primers:

Forward: 5'-AGATATCAACAAGTTTGTACAATGTCTGTGGCTTTCGCG-3'

Reverse: 5'-TGGATATCACCCTTTGTACATTACTCGTCATCTTCCTCAGGGT-3'.

The cDNA was cloned using InFusion cloning kit (Takara) into BsrG1 digested pHAGE-PI3KCA (Addgene, #116771) resulting in the obtention of pHAGE-SS18-SSX1/2 plasmids. Puromycin resistance gene from plasmids was substituted with the blasticidin one. To do so, pHAGE-SS18-SSX1/2 were digested with AjiI and ClaI and blasticidin cDNA was cloned using the InFusion cloning kit. Blasticidin cDNA was obtained with a similar procedure as SS18-SSX using pLX-TRE-dCas9-KRAB-MeCP2-BSD (Addgene #140690) as template and the following primers:

Forward:

5'-

GCCCCCGAACCACGGGGACGTGGTTTTCTTTGAAAAACACGATGATAATATGGCCACACATATGG
CCAAGCCTTTGTCTCA-3'

Reverse: 5'- AGGTTGATTAGGATCTATCGATTTAGCCCTCCCACACATAACCAG-3'

This second cloning resulted in vectors pHAGE-SS18-SSX1/2-BSDR. The control vector was obtained by a BsrG1 digestion of pHAGE-SS18-SSX2-BSDR and a ligation on itself resulting in the pHAGE-BSDR vector.

Production of VSV-g pseudotyped lentivirus was made by co-transfecting 70 – 80% confluent 293FT cells (gift from Dr Fabrice Lavial, CRCL) with lentiviral vectors pHAGE-SS18-SSX1/2 and pHAGE-SS18-SSX-BSDR plus pCMV-dR8.91 and pCMV-VSV-g plasmids (gift from Dr Carine Maisse, INRA UMR754, Lyon) using Lipofectamine 3000 in OptiMEM medium + GlutaMAX supplemented with 1mM Sodium Pyruvate and 5% FBS. Transfection medium was replaced 6h later by OptiMEM + Pyruvate + 5% FBS. Lentiviral supernatant was harvested 48 hours later, filtered through a 0.45 µm syringe filter and used either fresh or snap-frozen. For transduction, cell lines of interest were plated in 0.25 ml in 24 well plates and 0.25 ml of viral supernatant was added in presence of 10 µg/ml polybrene. 24h later viral supernatant was discarded and cells were cultured in their normal culture medium supplemented with blasticidine (10ug/ml) for two weeks.

Cell lysate collection, Western Blot and antibodies

Confluent cells were washed with cold PBS and scrapped in lysis buffer (Tris 10 mM pH 7.6; SDS 5; Glycerol 10%; Triton X-100 1%, DTT 100mM). After sonication proteins were dosed using Pierce 660nm Protein Assay Reagent (Thermo Fisher Scientific) and after loading on 4%-15% SDS-polyacrylamide gels (Bio-Rad) transferred to nitrocellulose membranes using Trans-Blot Turbo Transfer (Bio-Rad). Membranes were blocked for 1 hour at room temperature with 5% of nonfat dried milk for Netrin-1, EZH2 and GAPDH and with 5% of BSA and 1% of nonfat dried milk for SS18-SSX, H3K27me3 and UNC5B. Staining was performed overnight with primary antibody: anti-netrin1 antibody (Ab126729, Abcam), anti-SS18-SSX (E9X9V, Cell signaling technology) anti-UNC5B (D9M7Z, Cell signaling technology), anti-EZH2 (D2C9, Cell signaling technology), anti-tri-Methyl-Histone H3 (Lys27) (C36B11, Cell signaling technology) and anti-GAPDH (D16H11, Cell signaling technology). After washing, membranes were incubated with secondary antibody, goat anti-rabbit coupled with HRP for 1 hour at room temperature. West Dura Chemiluminescence System (Pierce) was used to intensify the signal. Imaging was performed using Chemidoch Touch (Bio-Rad).

RNA extraction, reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR)

Total RNA was isolated from cells using NucleoSpin RNA Plus kit (Macherey-Nagel), after washing the cells with PBS pH 7.4. After quantification, equal amounts of RNA (1 µg) were used for reverse transcription with iScript™ cDNA Synthesis Kit (Biorad) and PCR was performed using the ONEGreen FAST qPCR Premix (Ozyme) following the manufacturer's instructions.

RNA interference (siRNA)

Cells were transfected with siRNA (0.5µg/mL) directed against a mix of forward and reverse non-targeting control, netrin-1 or UNC5-B sequences. Transfection was performed using Lipofectamine reagent (Invivogen) and Opti-MEM medium (Gibco).

Tumor sphere formation assay

To look at sphere forming ability, cells were plated at different densities in 96-well ultralow attachment (ULA) plates (Corning) and in different mediums, listed in the following table. After 6 days of culture, spheres were counted by microscopy and results were averaged from 5 or more wells. Depending on the experiment, cells were either previously transfected with siRNA targeting netrin-1 or UNC5-B.

Cell line	Seeding density	Culture medium
AB1167	8000 cells/well	DMEM/F12 medium (Gibco), containing 1% PS, basic Fibroblast Growth Factor (bFGF, 20ng/mL), human Epidermal Growth Factor (hEGF, 20ng/mL), and B27 supplement (1:50).
Syo-1	3000 cells/well	DMEM/F12 medium (Gibco), containing 1% PS, basic Fibroblast Growth Factor (bFGF, 20ng/mL), human Epidermal Growth Factor (hEGF, 20ng/mL).
HS-SY-II	4000 cells/well	DMEM/F12 medium (Gibco), containing 1% PS, basic Fibroblast Growth Factor (bFGF, 20ng/mL) and human Epidermal Growth Factor (hEGF, 20ng/mL).

EZH2 inhibition

Cells were seeded at 3×10^5 cells in a 6-well plate and treated with the EZH2 inhibitor EPZ005687 (Euromedex), that was previously dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO). Cells were collected for RT-qPCR and Western blot analysis after 4 days of treatment at 5µM.

In vivo mice models

For xenograft experiments, animal work was done by Netris Pharma. Female Swiss nude mice, 6-weeks old, were purchased from Charles River laboratories (Les Oncins, France) and maintained in specific pathogen-free conditions (P-PAC, Lyon, France) and stored in sterilized filter-topped cages. Their care and housing were in accordance with institutional European guidelines as put forth by the ACCES local Ethical Committee (2021 P-PAC-123).

5×10^6 Aska and HS-SY-II cells were subcutaneously inoculated with Matrigel (Corning) in the dorsal flank of 8-week-old female Swiss/Nude mice. Tumor growth was evaluated by measurement of two perpendicular diameters of tumors with a caliper twice per week. Individual tumor volumes were calculated as $V = (\text{length} \times \text{width}^2) / 2$, a being the largest diameter, b the smallest. When tumors reached a volume of 200mm^3 , the mice were randomly separated in two groups and submitted anti-netrin-1 or control alone. Mice were sacrificed when individual tumours reached a predefined endpoint ($1000\text{-}2000 \text{mm}^3$). NP137 was supplied by Netris Pharma (Lyon, France)

Experiments with the inducible SS18-SSX upon Cre injection model was performed by Dr. Kevin Jones team in his lab as previously described [42]. NP137 was administered intraperitoneally (IP) administered 3 times per week at a dose of 10mg/kg. Doxorubicin was administered once a month, IP at a dose of 3mg/kg.

Statistical analysis

GraphPad Prism 8.0 was used to analyze experimental data. The experimental data are presented as the means \pm SEM, tests used are indicated in figures legends. $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Acknowledgements

The authors thank the Groupe Sarcomes Français for providing synovial sarcoma samples and clinical data, especially the following institutions: Institut Bergonié, Centre François Baclesse, Centre Jean Perrin, Centre Georges-François Leclerc, Centre Oscar Lambret, Assistance Publique - Hôpitaux de Marseille, Centre Hospitalier Universitaire de Montpellier, Institut de Cancérologie de Montpellier, Institut de Cancérologie de Lorraine, Institut de Cancérologie de l'Ouest, Institut Curie, Centre Eugène Marquis, Institut Universitaire du Cancer de Toulouse, Centre Hospitalier Régional Universitaire de Tours and Institut Gustave Roussy.

They also thank the MyoLine platform from Institut de Myologie for kindly providing the AB1167 and AB1079 immortalized myoblasts.

References

- [1] T. E. Kennedy, T. Serafini, JoséR. de la Torre, et M. Tessier-Lavigne, « Netrins are diffusible chemotropic factors for commissural axons in the embryonic spinal cord », *Cell*, vol. 78, n° 3, p. 425-435, août 1994, doi: 10.1016/0092-8674(94)90421-9.
- [2] T. Serafini, T. E. Kennedy, M. J. Gaiko, C. Mirzayan, T. M. Jessell, et M. Tessier-Lavigne, « The netrins define a family of axon outgrowth-promoting proteins homologous to *C. elegans* UNC-6 », *Cell*, vol. 78, n° 3, p. 409-424, août 1994, doi: 10.1016/0092-8674(94)90420-0.
- [3] K. L. W. Sun, J. P. Correia, et T. E. Kennedy, « Netrins: versatile extracellular cues with diverse functions », *Development*, vol. 138, n° 11, p. 2153-2169, juin 2011, doi: 10.1242/dev.044529.
- [4] P. Mehlen, S. Rabizadeh, S. J. Snipas, N. Assa-Munt, G. S. Salvesen, et D. E. Bredesen, « The DCC gene product induces apoptosis by a mechanism requiring receptor proteolysis », *Nature*, vol. 395, n° 6704, Art. n° 6704, oct. 1998, doi: 10.1038/27441.
- [5] F. Llambi, F. Causeret, E. Bloch-Gallego, et P. Mehlen, « Netrin-1 acts as a survival factor via its receptors UNC5H and DCC », *EMBO J*, vol. 20, n° 11, p. 2715-2722, juin 2001, doi: 10.1093/emboj/20.11.2715.
- [6] A.-M. Negulescu et P. Mehlen, « Dependence receptors – the dark side awakens », *The FEBS Journal*, vol. 285, n° 21, p. 3909-3924, 2018, doi: 10.1111/febs.14507.
- [7] A. D. Papanastasiou, G. Pampalakis, D. Katsaros, et G. Sotiropoulou, « Netrin-1 overexpression is predictive of ovarian malignancies », *Oncotarget*, vol. 2, n° 5, p. 363-367, mai 2011, doi: 10.18632/oncotarget.258.
- [8] M. Grandin *et al.*, « Inhibition of DNA methylation promotes breast tumor sensitivity to netrin-1 interference », *EMBO Mol Med*, vol. 8, n° 8, p. 863-877, août 2016, doi: 10.15252/emmm.201505945.
- [9] T. Sanvoranart *et al.*, « Targeting Netrin-1 in glioblastoma stem-like cells inhibits growth, invasion, and angiogenesis », *Tumor Biol.*, vol. 37, n° 11, p. 14949-14960, nov. 2016, doi: 10.1007/s13277-016-5314-5.
- [10] S. Kaufmann, S. Kuphal, T. Schubert, et A. K. Bosserhoff, « Functional Implication of Netrin Expression in Malignant Melanoma », *Cell Oncol*, vol. 31, n° 6, p. 415-422, 2009, doi: 10.3233/CLO-2009-0491.
- [11] U. Kefeli *et al.*, « Netrin-1 concentrations in patients with advanced gastric cancer and its relation with treatment », *Biomarkers*, vol. 17, n° 7, p. 663-667, nov. 2012, doi: 10.3109/1354750X.2012.709882.
- [12] C. Delloye-Bourgeois *et al.*, « Netrin-1 acts as a survival factor for aggressive neuroblastoma », *J Exp Med*, vol. 206, n° 4, p. 833-847, avr. 2009, doi: 10.1084/jem.20082299.
- [13] C. Delloye-Bourgeois *et al.*, « Interference with netrin-1 and tumor cell death in non-small cell lung cancer », *J Natl Cancer Inst*, vol. 101, n° 4, p. 237-247, févr. 2009, doi: 10.1093/jnci/djn491.
- [14] A. Paradisi *et al.*, « Netrin-1 up-regulation in inflammatory bowel diseases is required for colorectal cancer progression », *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 106, n° 40, p. 17146-17151, oct. 2009, doi: 10.1073/pnas.0901767106.
- [15] J. Fitamant *et al.*, « Netrin-1 expression confers a selective advantage for tumor cell survival in metastatic breast cancer », *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 105, n° 12, p. 4850-4855, mars 2008, doi: 10.1073/pnas.0709810105.

- [16] M. Grandin *et al.*, « Structural Decoding of the Netrin-1/UNC5 Interaction and its Therapeutical Implications in Cancers », *Cancer Cell*, vol. 29, n° 2, p. 173-185, févr. 2016, doi: 10.1016/j.ccell.2016.01.001.
- [17] M. N. Aytekin, R. Öztürk, K. Amer, et A. Yapar, « Epidemiology, incidence, and survival of synovial sarcoma subtypes: SEER database analysis », *J Orthop Surg (Hong Kong)*, vol. 28, n° 2, p. 2309499020936009, mai 2020, doi: 10.1177/2309499020936009.
- [18] J. Clark *et al.*, « Identification of novel genes, SYT and SSX, involved in the t(X;18)(p11.2;q11.2) translocation found in human synovial sarcoma », *Nat Genet*, vol. 7, n° 4, p. 502-508, août 1994, doi: 10.1038/ng0894-502.
- [19] B. de Leeuw, M. Balemans, D. Olde Weghuis, et A. Geurts van Kessel, « Identification of two alternative fusion genes, SYT-SSX1 and SYT-SSX2, in t(X;18)(p11.2;q11.2)-positive synovial sarcomas », *Hum Mol Genet*, vol. 4, n° 6, p. 1097-1099, juin 1995, doi: 10.1093/hmg/4.6.1097.
- [20] B. Skytting *et al.*, « A novel fusion gene, SYT-SSX4, in synovial sarcoma », *J Natl Cancer Inst*, vol. 91, n° 11, p. 974-975, juin 1999, doi: 10.1093/jnci/91.11.974.
- [21] M. Nagai *et al.*, « Analysis of transforming activity of human synovial sarcoma-associated chimeric protein SYT-SSX1 bound to chromatin remodeling factor hBRM/hSNF2 α », *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 98, n° 7, p. 3843-3848, mars 2001, doi: 10.1073/pnas.061036798.
- [22] C. Thaete *et al.*, « Functional Domains of the SYT and SYT-SSX Synovial Sarcoma Translocation Proteins and Co-Localization with the SNF Protein BRM in the Nucleus », *Human molecular genetics*, vol. 8, p. 585-91, mai 1999, doi: 10.1093/hmg/8.4.585.
- [23] M. J. McBride *et al.*, « The SS18-SSX Fusion Oncoprotein Hijacks BAF Complex Targeting and Function to Drive Synovial Sarcoma », *Cancer Cell*, vol. 33, n° 6, p. 1128-1141.e7, juin 2018, doi: 10.1016/j.ccell.2018.05.002.
- [24] C. Kadoch *et al.*, « Dynamics of BAF–Polycomb complex opposition on heterochromatin in normal and oncogenic states », *Nat Genet*, vol. 49, n° 2, Art. n° 2, févr. 2017, doi: 10.1038/ng.3734.
- [25] U. Jadhav *et al.*, « Acquired Tissue-Specific Promoter Bivalency Is a Basis for PRC2 Necessity in Adult Cells », *Cell*, vol. 165, n° 6, p. 1389-1400, juin 2016, doi: 10.1016/j.cell.2016.04.031.
- [26] P. Voigt, W.-W. Tee, et D. Reinberg, « A double take on bivalent promoters », *Genes Dev.*, vol. 27, n° 12, p. 1318-1338, juin 2013, doi: 10.1101/gad.219626.113.
- [27] J. Lengrand *et al.*, « Pharmacological targeting of netrin-1 inhibits EMT in cancer », *Nature*, vol. 620, n° 7973, Art. n° 7973, août 2023, doi: 10.1038/s41586-023-06372-2.
- [28] P. A. Cassier *et al.*, « Netrin-1 blockade inhibits tumour growth and EMT features in endometrial cancer », *Nature*, vol. 620, n° 7973, p. 409-416, 2023, doi: 10.1038/s41586-023-06367-z.
- [29] P. N. Harter *et al.*, « Netrin-1 expression is an independent prognostic factor for poor patient survival in brain metastases », *PLoS One*, vol. 9, n° 3, p. e92311, 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0092311.
- [30] L. Jerby-Arnon *et al.*, « Opposing immune and genetic mechanisms shape oncogenic programs in synovial sarcoma », *Nat Med*, vol. 27, n° 2, p. 289-300, févr. 2021, doi: 10.1038/s41591-020-01212-6.
- [31] S. Kawano *et al.*, « Preclinical Evidence of Anti-Tumor Activity Induced by EZH2 Inhibition in Human Models of Synovial Sarcoma », *PLoS One*, vol. 11, n° 7, p. e0158888, juill. 2016, doi: 10.1371/journal.pone.0158888.

- [32] M. Haldar, J. D. Hancock, C. M. Coffin, S. L. Lessnick, et M. R. Capecchi, « A Conditional Mouse Model of Synovial Sarcoma: Insights into a Myogenic Origin », *Cancer Cell*, vol. 11, n° 4, p. 375-388, avr. 2007, doi: 10.1016/j.ccr.2007.01.016.
- [33] K. Mamchaoui *et al.*, « Immortalized pathological human myoblasts: towards a universal tool for the study of neuromuscular disorders », *Skeletal Muscle*, vol. 1, n° 1, p. 34, déc. 2011, doi: 10.1186/2044-5040-1-34.
- [34] N. Naka *et al.*, « Synovial Sarcoma Is a Stem Cell Malignancy », *STEM CELLS*, vol. 28, n° 7, p. 1119-1131, 2010, doi: 10.1002/stem.452.
- [35] B. Ducarouge *et al.*, « Netrin-1 blockade inhibits tumor associated Myeloid-derived suppressor cells, cancer stemness and alleviates resistance to chemotherapy and immune checkpoint inhibitor », *Cell Death Differ*, vol. 30, n° 10, p. 2201-2212, oct. 2023, doi: 10.1038/s41418-023-01209-x.
- [36] A. Paradisi *et al.*, « NF- κ B Regulates Netrin-1 Expression and Affects the Conditional Tumor Suppressive Activity of the Netrin-1 Receptors », *Gastroenterology*, vol. 135, n° 4, p. 1248-1257, oct. 2008, doi: 10.1053/j.gastro.2008.06.080.
- [37] A. Paradisi *et al.*, « Combining chemotherapeutic agents and netrin-1 interference potentiates cancer cell death », *EMBO Molecular Medicine*, vol. 5, n° 12, p. 1821-1834, déc. 2013, doi: 10.1002/emmm.201302654.
- [38] L. Su *et al.*, « Deconstruction of the SS18-SSX Fusion Oncoprotein Complex: Insights into Disease Etiology and Therapeutics », *Cancer Cell*, vol. 21, n° 3, p. 333-347, mars 2012, doi: 10.1016/j.ccr.2012.01.010.
- [39] C. Kadoch et G. R. Crabtree, « Reversible Disruption of mSWI/SNF (BAF) Complexes by the SS18-SSX Oncogenic Fusion in Synovial Sarcoma », *Cell*, vol. 153, n° 1, p. 71-85, mars 2013, doi: 10.1016/j.cell.2013.02.036.
- [40] P. Lagarde *et al.*, « Chromosome Instability Accounts for Reverse Metastatic Outcomes of Pediatric and Adult Synovial Sarcomas », *Journal of Clinical Oncology*, janv. 2013, doi: 10.1200/JCO.2012.46.0147.
- [41] C. G. Joseph *et al.*, « Exomic Analysis of Myxoid Liposarcomas, Synovial Sarcomas, and Osteosarcomas », *Genes Chromosomes Cancer*, vol. 53, n° 1, p. 15-24, janv. 2014, doi: 10.1002/gcc.22114.
- [42] A. Banito *et al.*, « The SS18-SSX Oncoprotein Hijacks KDM2B-PRC1.1 to Drive Synovial Sarcoma », *Cancer Cell*, vol. 33, n° 3, p. 527-541.e8, mars 2018, doi: 10.1016/j.ccell.2018.01.018.
- [43] M. Haldar, M. L. Hedberg, M. F. Hockin, et M. R. Capecchi, « A CreER based random induction strategy for modeling translocation-associated sarcomas in mice », *Cancer Res*, vol. 69, n° 8, p. 3657-3664, avr. 2009, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-4127.

Figure legends

Figure 1: Netrin-1 and UNC5-B are particularly express among synovial sarcoma

A – B Netrin-1 (**A**) and UNC5-B (**B**) expression within tumors from 1246 patients with sarcomas that were analyzed by RNA sequencing in the anapathology platform of the Centre Léon Bérard (CLB) The number of patients for each subtype is indicated between brackets. **C.** Netrin-1 and UNC5-B level of expression in 10 different human tumors of synovial sarcoma analyzed by single cell RNA sequencing (Jerby-Arnon et al., 2021). Netrin-1 and UNC5-B are expressed in the malignant component (Blue components showed on the far-left image)

Figure 2: Netrin-1 is a marker of poor prognosis in synovial sarcoma

A-B. Kaplan-Meier curves representing survival probabilities (**A**) and metastasis occurrence probabilities (**B**) among time in patient with Synovial Sarcomas (SS) depending on their expression of netrin-1 ($n_{\text{netrin-1 negative}} = 33$; $n_{\text{netrin-1 positive}} = 50$) (netrin-1 level was measured by immunohistochemistry (IHC) and quantified by an objective anatomopathologist), Gehan-Breslow-Wilcoxon test, * $p < 0.05$.

Figure 3: SS18-SSX controls netrin-1 and UNC5-B expression through epigenetic modifications

A. Immunoblot of UNC5-B and netrin-1 on various SS cell lines **B.** Netrin-1 and UNC5-B expression level in various SS cell lines by RT-qPCR **C.** Netrin-1 transcriptomic (visium - left) and protein (immunohistochemistry - right) expression in human SS tumors showing that netrin-1 expression is heterogenous. In the visium, red dots indicate pool of tumoral cells that express netrin-1 **D.** Immunoblot of netrin-1, UNC5-B and SS18-SSX on various cell lines upon ectopic expression of SS18-SSX2 showing that the fusion protein induce netrin-1 and UNC5-B expression **E.** Chromatin Immunoprecipitation Sequencing (ChIP-seq) showing BAF and PRC2 binding locations on netrin-1 and UNC5-B genes, from GEO dataset GSE108028 (McBride et al., 2018). **F.** Netrin-1 expression level in CRL7250 cells upon ectopic expression of SS18-SSX1/2 **G.** Netrin-1 expression level analyzed by RT-qPCR in AB1167 and Syo-1 cells upon 4 days of treatment with a PRC2 inhibitor (EZH2i) EPZ005687 (Euromedex).

Figure 4: Netrin-1 and UNC5-B modulate cellular plasticity

A. Phase contrast image of AB1167 control and AB1167 SS18-SSX2 cells showing a morphologic change upon SS18-SSX2 ectopic expression showing that SS18-SSX2 cells undergo a morphologic change upon SS18-SSX2 expression. **B.** Mean number of spheres obtained with AB1167 control or AB1167 SS18-SSX2 cultivated in low adherence and phase contrast image of AB1167 control and AB1167 SS18-SSX2 of the spheres. No spheroid is observed in AB1167 control cells. ($p > 0.05$; $n = 3$) **C.** Phase contrast image of HS-SY-II and Syo-1 spheres formed upon culture in low adherence conditions. **D.** Mean number of spheres obtained with Syo-1 cells transfected with control, netrin-1 or UNC5-B siRNA cultivated in low adherence conditions.

Figure 5: NP137 inhibits tumor growth as a single agent in a genetically engineered mouse

A. Schematic of the genetically engineered synovial sarcoma mouse model (SSM2) from Dr. Jones lab (Huntsman Cancer Institute). Cre injection mediates recombination between the two LoxP sites in mice thereby removing the transcriptional stop signal and allowing transcription (arrow) of the SS18-SSX2 mRNA from the endogenous ROSA26 promoter. **B.** Netrin-1 and UNC5-B expression in muscles without Cre injection (healthy muscle) and in tumors after injection of the Cre recombinase into the muscle (tumor) in SSM2 model. **C.** Kinetics of evolution of relative tumor volume over time of tumors from the SSM2 model treated or not with NP137, 10mg/kg, IP, 3 times a week (For each group n=7; 2way ANOVA; ** p<0.005)

Supplementary Figure legends

Supplementary Figure 1

A. Kaplan-Meier curves representing survival probabilities among time in patient with Synovial Sarcomas (SS) depending on the SS18-SSX status (n=33) Gehan-Breslow-Wilcoxon test, $p > 0.05$. **B.** Netrin-1 expression in human tumors samples measured by IHC (Allread score) depending on the tumor fusion transcript ($n_{SS18-SSX1} = 19$; $n_{SS18-SSX2} = 14$) **C.** Netrin-1 expression quantified by IHC in each SS subtype (NOS : Non Otherwise Specified) **D.** Immunoblot of SS18-SSX on various SS cell lines showing that all cell lines except SW982 express SS18-SSX **E.** Immunoblot of EZH2, H3K27me3 and SS18-SSX in AB1167 control or Syo-1 cells with or without treatment with EZH2 inhibitor (EZH2i) showing a decrease in H3K27me3 histone mark without affecting global level of EZH2. **F.** Evolution of the Relative tumor volume of tumors from a transgenic mice model treated with control, NP137 alone (10mg/kg, IP, 3 times a week), doxorubicin (3mg/kg, IP, Once a month) alone or in combination with NP137 (same dose and schedule as monotherapies) ($n_{Ctrl} = 7$; $n_{NP137} = 7$; $n_{doxorubicin} = 5$; $n_{doxorubicin+NP137} = 7$)

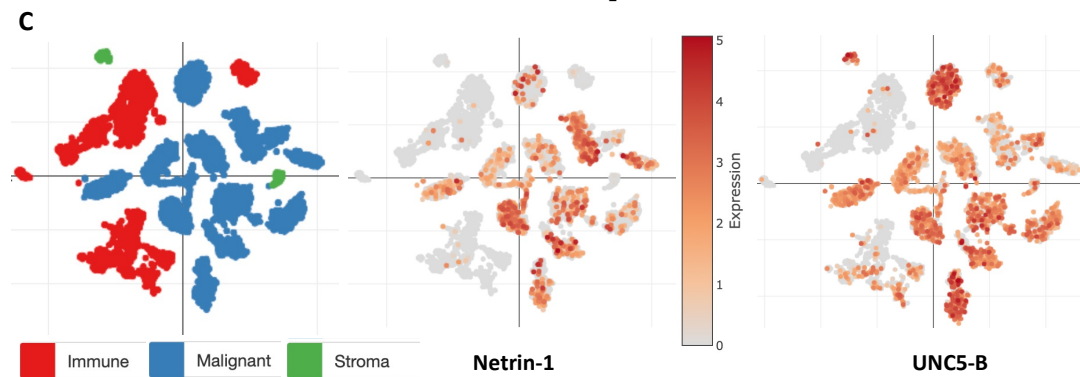
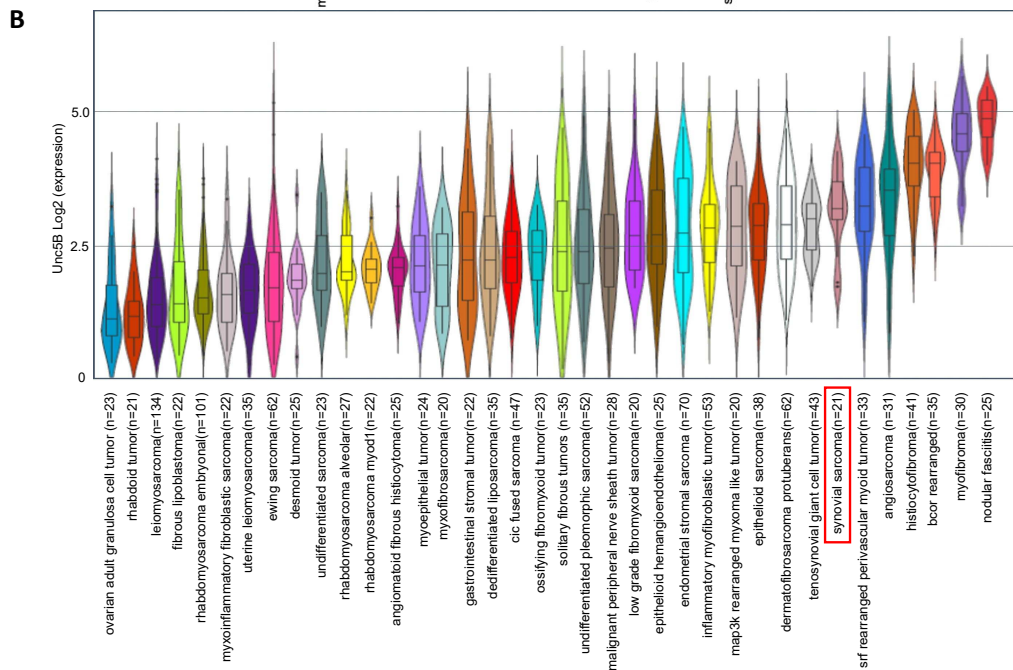
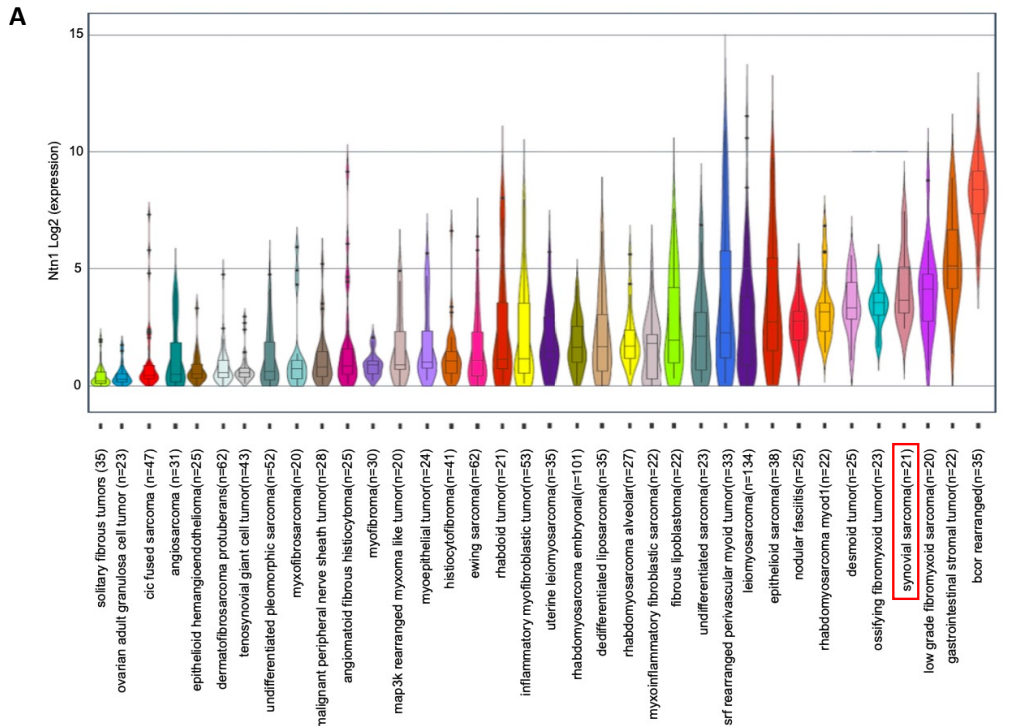


Figure 1: *Netrin-1 and UNC5-B are particularly express among synovial sarcoma*

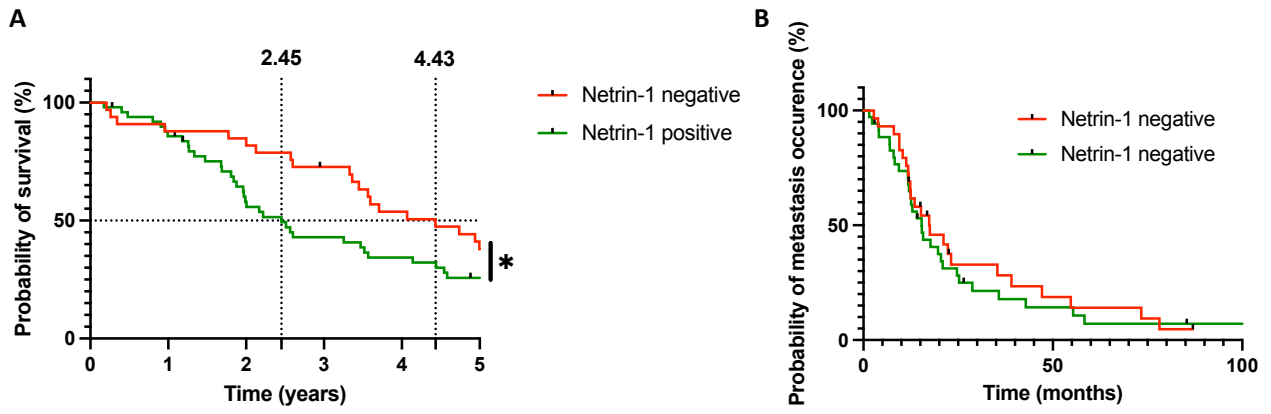


Figure 2 : Netrin-1 is a marker of poor prognosis in synovial sarcoma

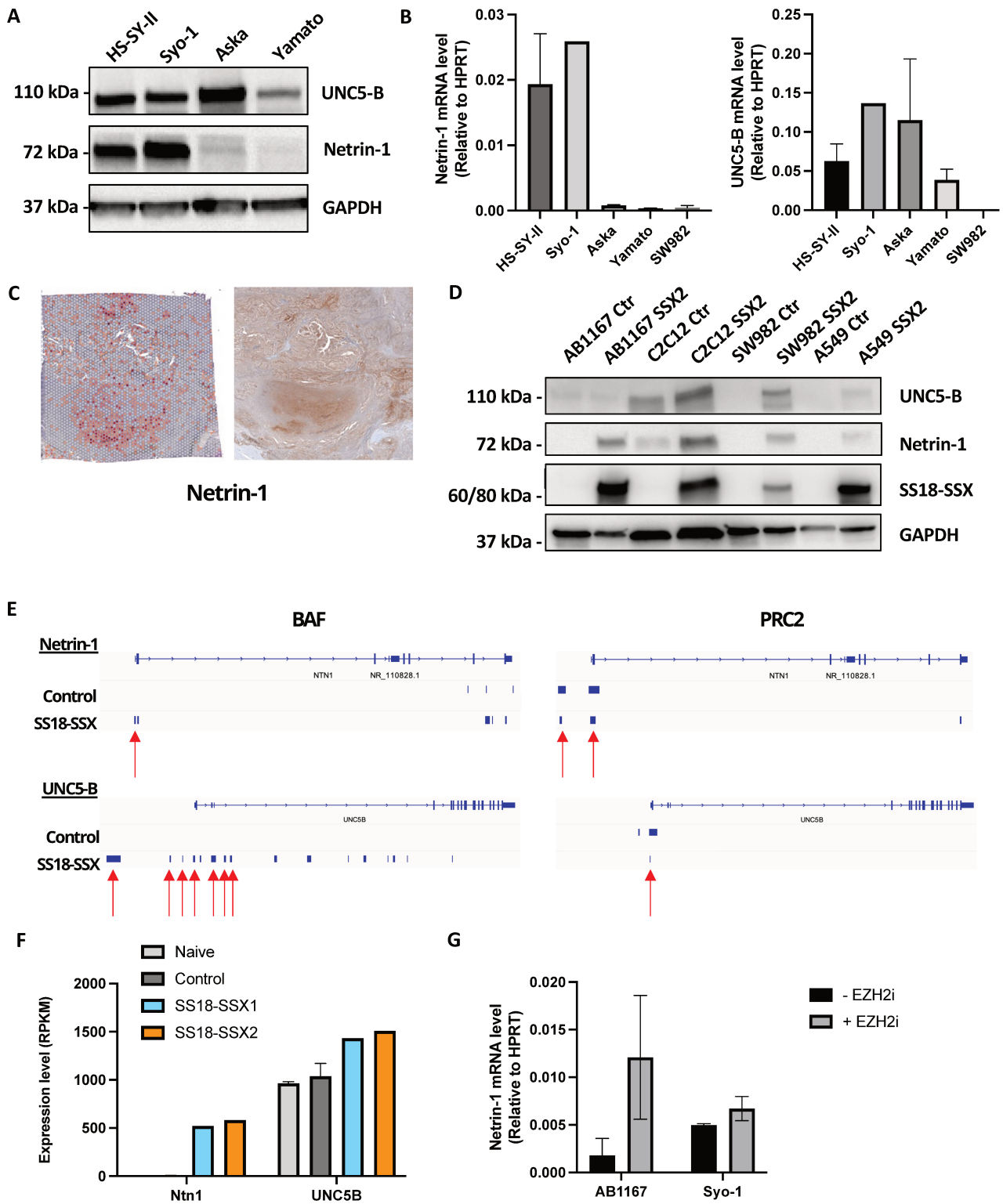


Figure 3: SS18-SSX controls netrin-1 and UNC5-B expression through epigenetic modifications

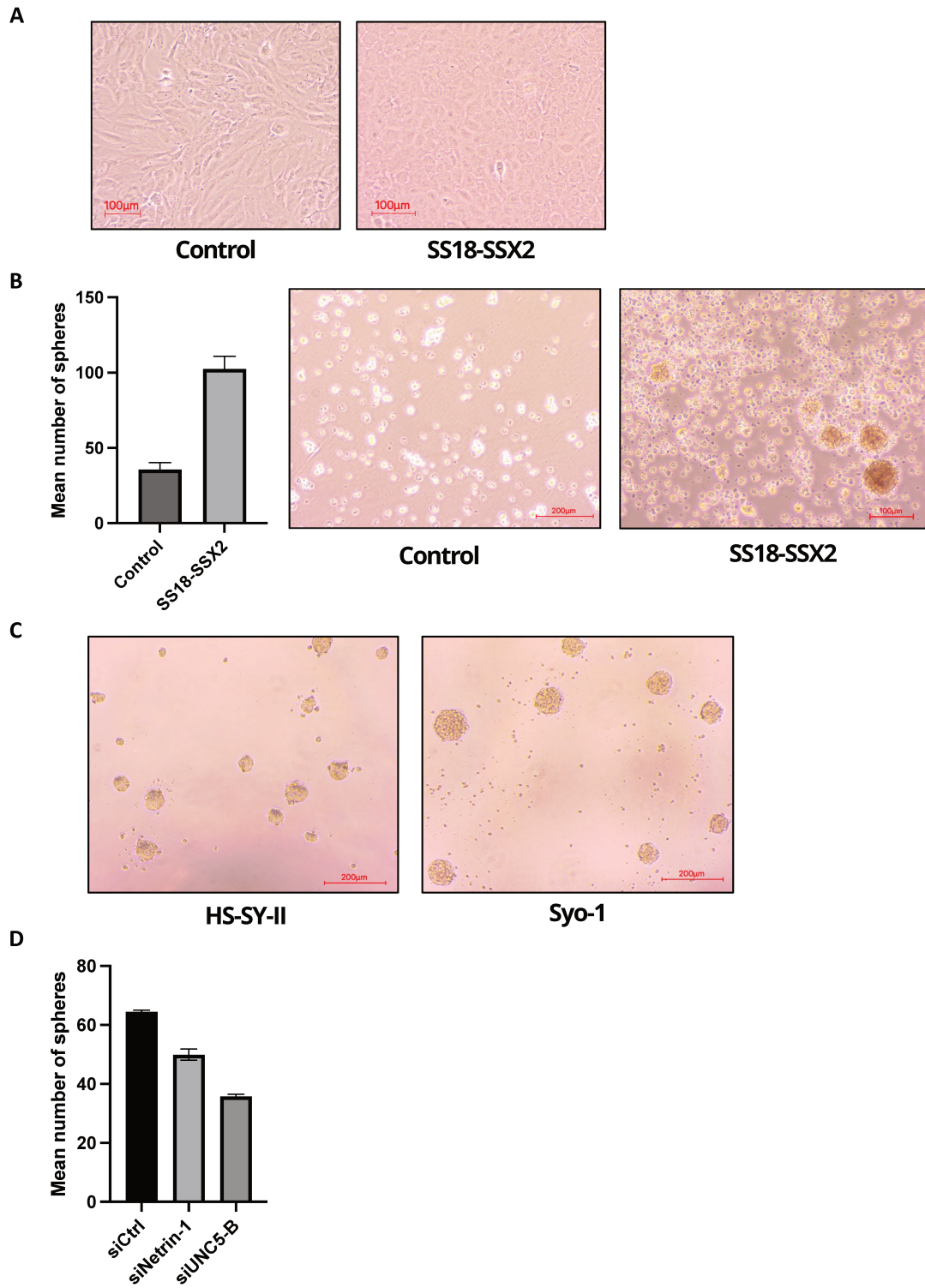


Figure 4 : Netrin-1 and UNC5-B modulate cellular plasticity

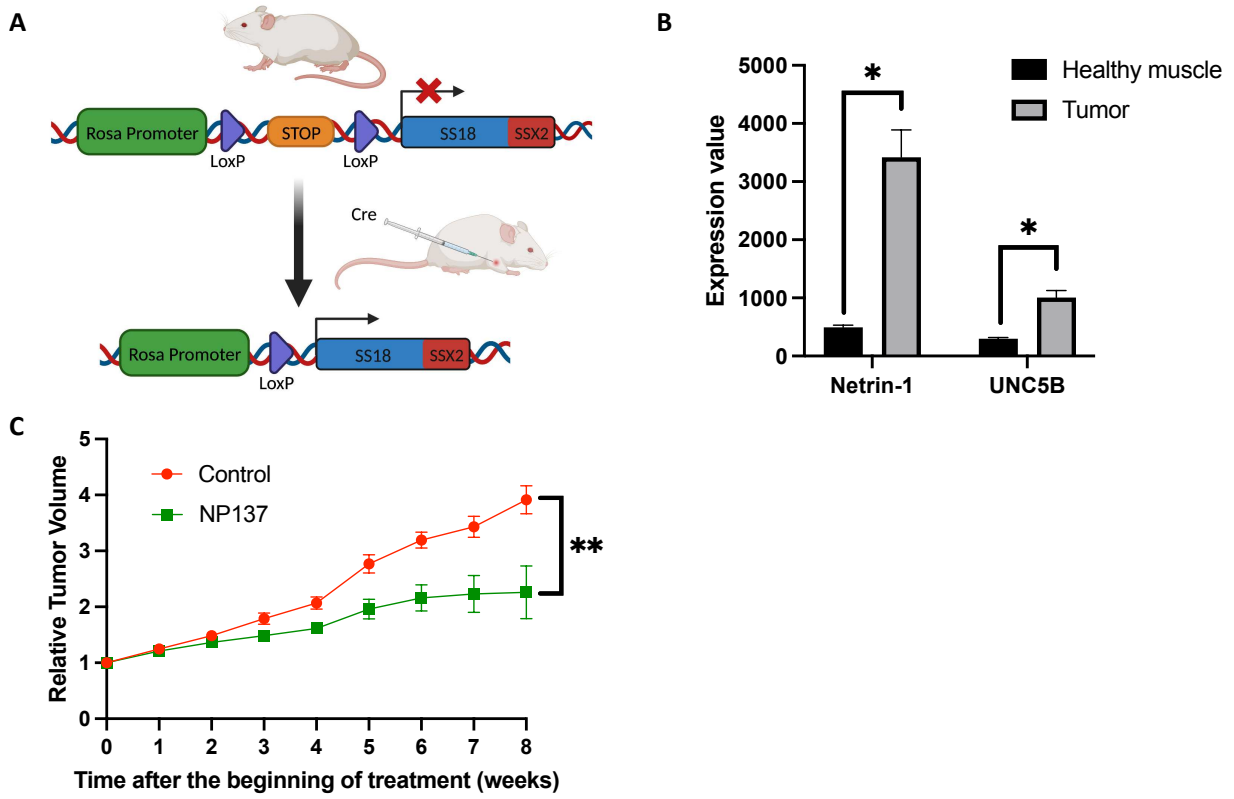
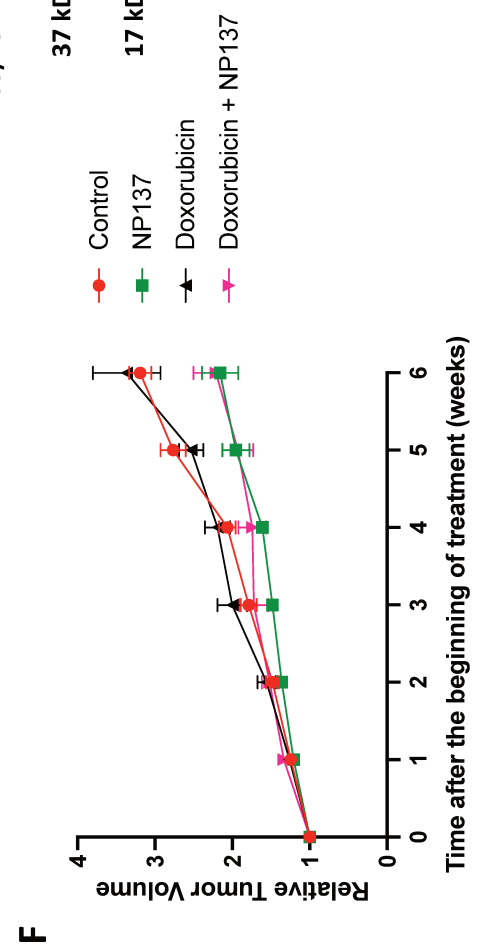
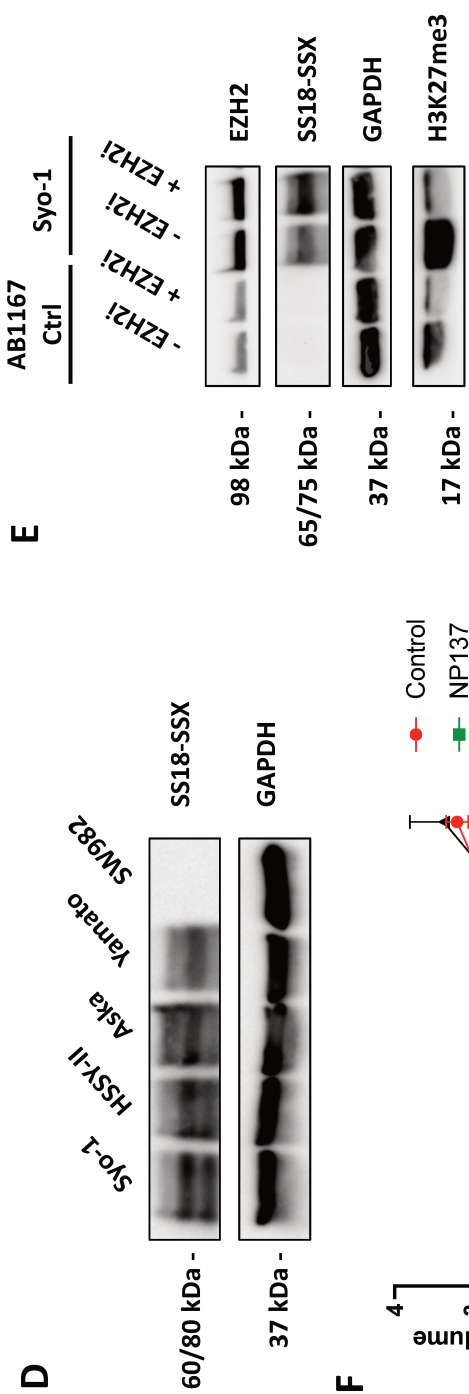
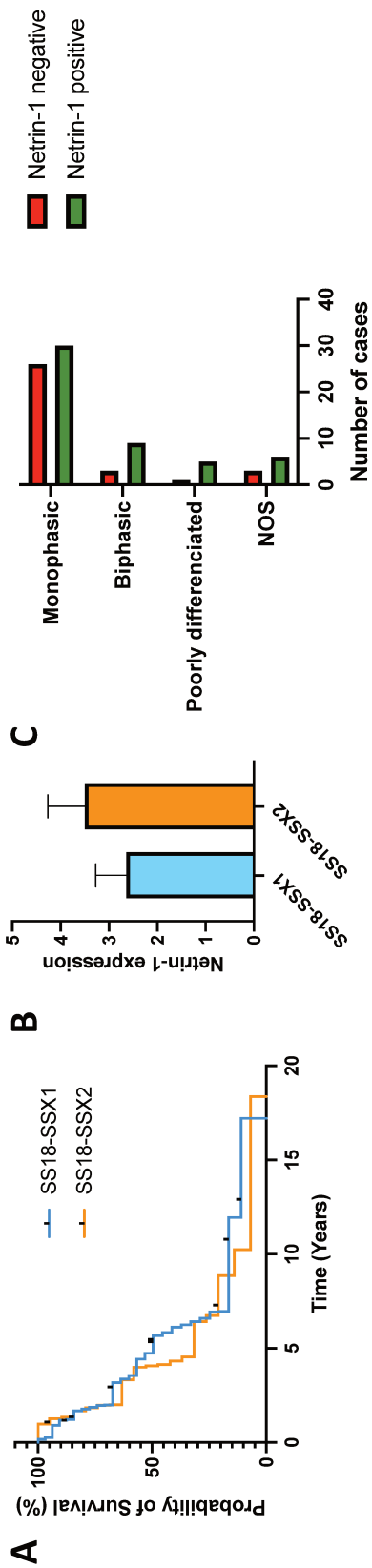


Figure 5 : NP137 inhibits tumor growth as a single agent in a genetically engineered mouse



Discussion et perspectives

Au cours de la seconde partie de ma thèse, j'ai pu initier un projet prometteur concernant nétrine-1 dans les SS, sa régulation, son rôle oncogénique mais également son potentiel de ciblage thérapeutique. Bien que plusieurs expériences restent à réaliser afin d'apporter une réelle solidité aux résultats déjà obtenus, nous avons observé une surexpression de nétrine-1 dans les SS au sein desquels elle est un marqueur de mauvais pronostic. Nos travaux ont montré que la protéine de fusion SS18-SSX, à l'origine de la pathologie, est responsable de l'expression de nétrine-1 dans ces tumeurs. Les analyses de données publiées suggèrent un réveil transcriptionnel de nétrine-1 lié aux phénomènes épigénétiques induits par la translocation. En effet, la translocation provoque une modification du paysage chromatinien passant par la relocalisation des complexes BAF et l'éviction des PRC2. Cette découverte est majeure car elle permettrait pour la première fois d'expliquer la surexpression de nétrine-1, protéine de guidage axonal normalement exprimée uniquement lors du développement, mais ici ré-exprimée dans les cancers. Enfin, grâce à un modèle de souris génétiquement modifiée, nous avons également montré le potentiel de nétrine-1 en tant que cible thérapeutique dans les SS via un traitement au NP137 permettant de réduire significativement le volume tumoral.

Dans cette discussion, nous aborderons tout d'abord les difficultés rencontrées au cours de cette étude avant de nous concentrer sur la critique des résultats obtenus et les expériences à venir pour les solidifier.

1. Difficultés

Parmi les difficultés rencontrées dans ce projet, la limitation des ressources pour réaliser nos études est une difficulté majeure. En effet, il n'existe pas beaucoup d'outils pour étudier les SS et la plupart ne sont pas facilement accessibles.

Ainsi, la base de données Cellosaurus indique qu'il existe 41 lignées cellulaires humaines de SS. Cependant, seulement 4 sont disponibles dans des banques cellulaires publiques : Aska, Yamato, HS-SY-II et SW982, ce qui est très peu en comparaison à d'autres sarcomes comme les ostéosarcomes pour lesquels plus de 30 lignées sont disponibles dans ces banques [391]. Grâce à une équipe japonaise, nous avons également pu avoir accès à la lignée Syo-1. Sur ces 5 lignées, les lignées Yamato et Syo-1 présentent des mutations additionnelles des gènes *TP53* et *CTNNB1* respectivement, non systématiquement présentes dans les tumeurs humaines, [268], [392] tandis que la lignée SW982 ne contient pas la fusion SS18-SSX ce qui fait d'ailleurs s'interroger sur sa légitimité à être décrite comme provenant d'un SS [393].

En effet, la charge mutationnelle retrouvée dans les SS est faible [352]–[354] et les mutations de *TP53* et *CTNNB1* sont retrouvées dans moins de 15% des cas. Il nous semblait donc plus pertinent d'utiliser en priorité les lignées Aska et HS-SY-II notamment dans nos expériences de xénogreffes. Compte tenu de la pression de sélection nécessaire à l'établissement des lignées et les dérives génétiques subséquentes aux nombreux passages qu'elles peuvent subir, il est toujours avantageux de pouvoir bénéficier d'un large panel de lignées cellulaires pour ses différentes expériences ce qui n'est pas possible dans notre cas et a pu nous porter préjudice notamment dans notre impossibilité de montrer un effet du NP137 sur des modèles de xénogreffes.

Une autre difficulté que nous n'avions pas anticipée est la toxicité de la fusion lorsque cette dernière est incorporée dans les cellules. En me basant sur la littérature et la probable origine musculaire de la maladie [357], j'ai fait le choix de privilégier des myoblastes humains immortalisés comme cellules receveuses de la fusion (AB1079 et AB1167) plutôt que des fibroblastes ou des myoblastes murins qui me semblaient être des modèles moins pertinents. A l'issue de l'infection des cellules, nous avons observé une mort cellulaire importante et un arrêt de la prolifération des cellules vivantes. Cela s'explique par la probable destruction des complexes cBAF et la mise en place de la compensation de cette perte dans seulement un échantillon de cellules compétentes comme cela a pu être exposé par Li *et al* [307].

Bien que cohérent avec la toxicité décrite dans la littérature [357], [366], nous ne nous attendions pas à ce que l'obtention de ces lignées soit si longue. La durée de la phase de sélection des cellules ayant incorporé la fusion a en effet eu un lourd impact. L'un des inconvénients des lignées utilisées est leur résistance à plusieurs antibiotiques due à leur immortalisation [394]. Après différents tests, nous avons identifié qu'elles restaient sensibles à la blasticidine mais qu'une exposition pendant plusieurs semaines était obligatoire. Tout cumulé, un délai de presque deux mois supplémentaires à ce que l'on avait prévu a été nécessaire avant de pouvoir travailler sur ces modèles, impactant largement les expériences prévues de réaliser avant le rendu de ce manuscrit.

Un problème beaucoup plus technique, concernant les cellules censées exprimer SS18-SSX1, s'est également présenté lors de l'établissement de nos lignées. Tout d'abord, SS18-SSX1 était exprimée de façon moins importante que SS18-SSX2 dans les cellules transformées. Ensuite, bien qu'exprimée dans la lignée SW982, elle n'a pas donné lieu dans cette lignée à l'expression de nétrine-1. Enfin, dans les lignées AB1079 et A549, les cellules semblent avoir l'expression de la protéine de fusion tout en conservant leur résistance à la blasticidine. Ces constats nous ont fait douter de la qualité de notre modèle de cellules ayant incorporé SS18-SSX1 et nous avons préféré nous concentrer sur les cellules exprimant la translocation SS18-SSX2. Cela est d'ailleurs en phase avec nos expériences *in vivo* dans lesquelles SS18-SSX2 est conditionnellement exprimé.

Le test d'efficacité du NP137 sur le modèle murin transgénique a également été plus long que prévu. Ces tests ont été réalisés en collaboration avec l'équipe du Dr Kevin Jones aux Etats-Unis (University of Utah, Huntsman Cancer Institute) qui est le seul laboratoire à être en possession de ce modèle. Plusieurs facteurs indépendants de notre volonté ont entraîné un retard considérable, avec en premier lieu une difficulté du côté du laboratoire américain de reconstituer un élevage de leur modèle après l'arrêt total de ce dernier lors de la pandémie de COVID-19. J'ai quand même eu la chance d'obtenir les résultats concernant les impacts du traitement sur les volumes tumoraux avant le rendu de ce manuscrit. Je n'ai cependant pas encore pu avoir accès aux échantillons de tumeurs qu'ils vont nous envoyer dans un futur proche afin d'investiguer plus en profondeur l'impact du NP137 sur les tumeurs.

Ces délais non prévus ont entraîné des périodes de latence au cours desquelles j'ai mis mon temps à profit pour travailler sur des données publiées et notamment des données de *Chromatin ImmunoPrecipitation Sequencing* (ChIP-Seq). Bien que nous ayant apporté plusieurs informations, je me suis heurtée à un partage incomplet des résultats avec notamment une absence de données dans certaines conditions, ne permettant ainsi pas de fournir des résultats solides sur lesquels se reposer de façon fiable. Malgré nos sollicitations auprès de l'équipe concernée, nous n'avons pas réussi à obtenir les données manquantes et

avons donc décidé de les obtenir par nous-mêmes sur nos propres modèles, comme cela sera discuté dans la partie suivante sur la poursuite du projet.

Si la plupart de ces difficultés sont surmontables, elles ont pour point commun d'être très coûteuses en temps, ce qui nous a retardé pour développer certains points importants dans l'objectif d'une publication finalisée. Dans la suite de cette partie, outre la critique des résultats obtenus, nous verrons également les expérimentations qu'il reste à réaliser afin de compléter les résultats déjà acquis en vue de les publier dans les meilleurs délais.

2. Critique des résultats et expérimentations à venir

2.1 Nétrine-1 et sa valeur pronostic : critique de l'analyse de cohorte

L'analyse des données des patients atteints de SS de notre cohorte montre qu'elle est représentative de l'épidémiologie déjà décrite de la maladie avec par exemple un nombre de cas très légèrement plus élevé chez les hommes et une prédominance de la forme monophasique [216], [223].

On remarque cependant une moyenne d'âge au moment du diagnostic de 45 ans, ce qui est plus élevé que celui généralement décrit dans la littérature qui est situé entre 30 et 39 ans [215], [216]. Or, on constate également l'absence totale de patients appartenant à la population pédiatrique, expliquant ainsi cette différence. Ajouter des patients appartenant à cette catégorie d'âge dans notre analyse pourrait renforcer la pertinence de nos résultats montrant un impact pronostic de nétrine-1 sur la survie globale des patients, mais les cancers pédiatriques étant souvent très différents des cancers adultes, cela pourrait également perturber les résultats.

2.2 La modulation de l'expression de nétrine-1 : de nombreuses questions en suspens

Les expériences permettant d'investiguer la mécanistique autour de l'expression de nétrine-1 notamment au niveau épigénétique manquent à ce jour à notre projet. Nous avons montré que SS18-SSX induit l'expression de nétrine-1. Cependant, nous n'avons pas pu regarder la cinétique de cette induction à cause de la forte toxicité de la fusion et il n'est pas encore possible à l'heure actuelle d'établir le caractère direct ou indirect de cette induction. Des expériences complémentaires avec un gène rapporteur de nétrine-1 sont envisagées afin d'essayer de répondre à cette question, sachant les limites d'un gène rapporteur non intégré dans la chromatine pour une analyse d'un état chromatinien. La mutation des sites de fixation des acteurs tels que PRC2, qui se fixe sur les îlots CpG non-méthylés et qui sont très présents au niveau du promoteur de netrine-1, et BAF au niveau du promoteur des gènes pourrait également répondre à la question.

Dans une volonté d'identifier les partenaires protéiques (facteurs de transcription, partenaires intracellulaires liés au récepteur...) différenciellement exprimés entre les cellules positives ou négatives en nétrine-1, nous avons réalisé des analyses de spatial transcriptomiques (Visium) sur différentes coupes de tumeurs de patients, n'ayant pas accès à du tissu frais. Aucun résultat pertinent n'a pu être exploité à l'issue de ces analyses, ces derniers ne sont, par conséquent, pas montrés dans ce manuscrit. Nous pensons que cette

absence de résultat est due au fait que l'on ne puisse pas avoir une résolution à l'échelle d'une seule cellule avec ce type d'analyse.

Nous avons donc décidé de réaliser une analyse des transcriptomes à l'échelle d'une seule cellule en utilisant des tumeurs du modèle murin de SS du Dr Jones, traitées ou non au NP137, qui seront analysées via la technologie de *single cell RNA sequencing* (scRNAseq). Cela nous permettra de bien pouvoir comparer les cellules positives pour nétrine-1 aux cellules négatives mais également les modifications induites par le traitement.

En attendant ces résultats, nous avons cependant quelques pistes à explorer grâce aux résultats que nous avons déjà obtenus sur nos modèles et aux données de la littérature.

2.2.1 Pertinence des modèles

Afin d'étudier l'impact de SS18-SSX sur la modulation de l'expression de nétrine-1, nous avons utilisé deux stratégies complémentaires consistant soit à diminuer l'expression (*Knockdown* – KD) de SS18-SSX dans des lignées de SS soit faire s'exprimer la protéine de fusion dans d'autres lignées cellulaires. Outre les inconvénients déjà évoqués d'utiliser des lignées cellulaires, ces deux stratégies présentent chacune des avantages et des inconvénients que nous allons discuter.

Le KD de SS18-SSX permet d'avoir une cellule du lignage à l'origine de la maladie et dont le panel de facteurs de transcriptions présents lors de la transformation est le plus représentatif d'une tumeur. En effet, Boulay *et al.* ont postulé que c'est effectivement ce panel de facteurs qui induit l'expression d'éléments de régulation génique ou l'activation de programmes entraînant la transformation de la cellule [368]. Cependant, la durée minimale de KD nécessaire pour que la cellule retrouve son paysage épigénétique d'origine n'est pas connue et la reformation d'hétérochromatine peut-être longue voir incomplète [311], [354] autant d'éléments limitants de cette stratégie.

L'expression de la fusion dans d'autres lignées cellulaires se heurte au fait que la cellule à l'origine des tumeurs n'a pas encore été clairement identifiée. Ainsi, les lignages des CSMs et des précurseurs musculaires semblent tous les deux susceptibles d'être à l'origine des tumeurs [357], [371], [372]. Compte tenu de l'importance que semble avoir le panel de facteurs de transcriptions et le contexte cellulaire initialement présent dans la cellule, cette incertitude présente une limitation car les cellules transformées obtenues ne seront pas forcément représentatives de la pathologie. Cependant, toutes les cellules ne sont pas permissives à l'expression de la fusion et finissent par mourir [372]. On peut donc supposer que les cellules survivantes à l'issue de la transformation présentent des similitudes clés avec les cellules à l'origine de la maladie. L'utilisation de myoblastes immortalisés comme les AB1167 est tout à fait pertinente au regard d'une éventuelle origine musculaire de la maladie. Cependant, il a récemment été porté à notre attention que la méthode d'immortalisation de ces cellules par une surexpression de la *téломérase* (TERT) pouvait affecter la représentativité de notre modèle. En effet, deux mécanismes sont décrits dans la littérature pour assurer le maintien de la longueur des télomères dans les cellules : les mécanismes impliquant TERT et ceux ne l'impliquant pas (*Alternative Lengthening of Telomeres* (ALT)) [395]. Bien que des données spécifiques aux SS ne soient pas disponibles, il semble que le mécanisme ALT soit prédominant dans les STMs [396].

Ces deux stratégies présentent des failles, mais les combiner permettrait d'apporter des preuves des effets de SS18-SSX dans les cellules. Ainsi nous avons montré que la protéine

SS18-SSX semble bien être à l'origine de la levée d'inhibition de la transcription du gène de nétrine-1 dans les SS.

2.2.2 Induction de la transcription de nétrine-1 par la protéine de fusion SS18-SSX

2.2.2.1 Modification du paysage épigénétique

Comme il a été expliqué à de nombreuses reprises dans ce manuscrit, la modulation de l'expression des gènes par SS18-SSX est principalement décrite comme passant par une modulation du paysage chromatinien, il nous a donc semblé intéressant de nous pencher sur les changements opérés au niveau du gène de nétrine-1 mais également de son récepteur UNC5-B.

Les analyses de ChIP-Seq publiés ont mis en évidence des changements cohérents avec ce qui a été décrit dans la littérature concernant une relocalisation des complexes BAF associés à une éviction des PRC2 au niveau de certains loci spécifiques [354]. Cependant, il serait également intéressant d'avoir accès aux modifications des marques histones associées, données, qui bien que normalement disponibles, ne sont que partiellement accessibles. Pour faire face à ce manque de données, nous avons décidé de réaliser nous-même cette analyse qui est en cours de réalisation sur notre modèle AB1167.

2.2.2.2 Partenaires protéiques impliqués dans l'induction de l'expression de nétrine-1

Si SS18-SSX module le paysage épigénétique de nétrine-1, des partenaires protéiques tels que des facteurs de transcription sont cependant nécessaires pour son expression. En effet, la présence de SS18-SSX seule ne permet pas d'exprimer de façon systématique nétrine-1 comme en témoigne les IHCs de tumeurs de patients sur lesquelles on voit une expression hétérogène de nétrine-1.

Si les résultats du scRNAseq issu du modèle murin de SS pourront nous orienter vers les partenaires protéiques impliqués, quelques pistes plausibles ont été mises en lumière, notamment grâce aux lignées cellulaires Yamato et Syo-1 porteuses de mutations dans des gènes clés. En effet, un rôle de p53 ou de la voie Wnt pourrait être possible.

2.2.2.2.1 Un rôle de p53 ?

Codée par le gène *TP53*, la protéine p53 est un facteur de transcription impliqué dans le contrôle du cycle cellulaire et de l'apoptose. Bien que très peu muté dans les SS, une accumulation de p53 a tout de même été montré dans plus de 20% des cas [397]. Paradisi *et al.* ont montré dans plusieurs lignées cellulaires que son statut sauvage ou muté influence l'expression de nétrine-1. Ainsi, l'expression de la forme sauvage de p53 est associée à une expression de nétrine-1 [376].

De façon intéressante, on remarque que la lignée cellulaire Yamato bien qu'exprimant la fusion SS18-SSX est celle exprimant le niveau de nétrine-1 le plus faible mais qu'elle présente également une mutation dans le gène *TP53* ne permettant pas la synthèse d'une protéine fonctionnelle [268]. Il serait donc intéressant de réaliser un sauvetage de p53 dans cette lignée afin de voir si cela aboutit à l'expression de nétrine-1.

Si cela est bien le cas, nous pourrions regarder si SS18-SSX a un impact sur l'expression de p53 et le paysage épigénétique de son gène suggérant ainsi que SS18-SSX régule nétrine-1

de façon indirecte via p53. Nous évoquerons également dans le paragraphe **2.2.2.2.3** l'idée d'une interaction de SS18-SSX avec p53 qu'il serait intéressant de creuser.

2.2.2.2.2 Une implication de la voie Wnt/ β -caténine ?

La voie Wnt/ β -caténine joue divers rôles dans le développement animal mais également dans la cancérogenèse [398] (cf. **2.3.1.1.1**). Le gène *CTNNB1* codant pour la β -caténine est très rarement muté au sein des SS, cependant une accumulation de β -caténine dans le noyau a été décrite dans 30 à 60% des cas [392], [399]. Dans la lignée Syo-1, on trouve une mutation du 34^{ème} codon du gène *CTNNB1*. Bien que des altérations de ce codon n'aient pas montré d'effet sur le potentiel d'activation transcriptionnel du gène, la voie Wnt canonique ne semble que très peu affectée par le KD de SS18-SSX dans la lignée Syo-1 en comparaison à d'autres lignées de synoviosarcome [392].

Nous avons retrouvé ce faible impact du KD de SS18-SSX sur l'expression protéique de nétrine-1 ce qui nous fait nous interroger sur un potentiel rôle de la voie Wnt canonique sur l'expression de nétrine-1. Cette hypothèse est d'ailleurs soutenue par le fait que dans notre analyse de cohorte, environ 60% des patients expriment nétrine-1, faisant alors écho aux 60% décrits dans la littérature comme présentant une accumulation de β -caténine dans leur noyau. Une analyse IHC de la localisation de la β -caténine sur quelques tumeurs de patient positives et négatives à l'expression de nétrine-1 pourrait-être intéressante dans un premier temps pour soutenir ou non cette hypothèse.

2.2.2.2.3 Un rôle de SS18-SSX comme protéine échafaudage ?

Le rôle de SS18-SSX majoritairement décrit dans la littérature est son rôle de modulateur épigénétique. Cependant il se peut que le fait de la réduire à cette unique fonction soit une erreur. En effet, de plus en plus de travaux mettent en avant des interactions physiques entre SS18-SSX et différentes protéines comme les protéines régulatrices de la transcription ATF2 et TLE1 où elle joue un rôle de protéine échafaudage pour la formation d'un complexe de répression de la chromatine qui va être dirigé sur les loci cibles de ATF2 [363].

Très récemment, l'équipe de Isfort *et al.* a également montré une interaction de SS18-SSX avec les protéines β -caténine et YAP [400] protéines charnières des voies Wnt/ β -caténine et Hippo respectivement (cf. **2.3.1.1** et **2.3.1.2**). Cette équipe a initialement décrit une accumulation des protéines YAP et TAZ dans le noyau des cellules d'un grand nombre de tumeurs [401] sans que cela ne soit accompagné d'altérations génétiques significatives de la voie YAP/TAZ [402]. Plus tard, ils ont montré que la formation d'un complexe SS18-SSX-YAP- β -caténine potentialise l'activation des gènes cibles de ces protéines mais permet également la mise en place d'une interdépendance où β -caténine influence positivement la transcription des gènes cibles de YAP et vice-versa. Cette interdépendance entre les deux voies est perdue en l'absence de SS18-SSX, témoignant ainsi de son rôle non-anecdotique de protéine échafaudage.

Cette caractéristique d'une accumulation de protéine dans le noyau sans pour autant que cela soit accompagné de mutation du gène associé n'est pas sans rappeler ce qui est observé pour la protéine p53. Il serait donc intéressant d'investiguer une éventuelle interaction de p53 et SS18-SSX dans les SS avec par exemple des expériences d'immunoprécipitation.

2.2.2.2.4 Un rôle de ncPRC1.1 ?

Notre étude s'est concentrée sur la nétrine-1 dans les SS. Cependant, des données encore non-publiées ont également mis en lumière que les sarcomes appartenant à la famille des *Bcl6 CORepressor* (BCOR) réarrangés exprimaient également une grande quantité de nétrine-1. Les sarcomes de cette famille se caractérisent par une altération de BCOR qui peut se retrouver fusionnée avec la cycline B3, Master Mind Like co-activator 3 ou encore Zinc finger CCCH-type containing 7B entre autres [403].

BCOR est un membre du complexe ncPRC1.1 pour lequel une interaction avec SS18-SSX a été décrite via la sous-unité KDM2B [296]. Une activité d'activation de la transcription ayant été décrite pour ce complexe [305], on peut s'interroger sur un possible rôle de ce dernier dans l'expression de nétrine-1 dans ces deux types de sarcomes.

2.2.3 Partenaires protéiques impliqués dans la voie de signalisation induite par nétrine-1

La signalisation positive induite par la fixation de nétrine-1 sur ses RD reste très peu documentée et aucune voie de signalisation canonique spécifique n'a été décrite à ce jour. Nous espérons que les résultats du scRNAseq nous apporte des pistes sur les voies de signalisation à investiguer. Cependant, cette absence d'information n'empêche pas d'étudier le rôle de nétrine-1 à une échelle plus globale par exemple sur la croissance tumorale.

2.2.3.1 Ligand des récepteurs à dépendance

Au cours de notre étude, le rôle de nétrine-1 a été montré *in vivo* où son inhibition impacte négativement la croissance tumorale. Compte tenu de son rôle en tant que ligand des récepteurs à dépendance [44]–[46], nous supposons que cette diminution de la croissance tumorale est liée à une mort des cellules par apoptose. Il est donc prévu de réaliser des IHCs contre la protéine Caspase-3 clivée sur les blocs de tumeurs traitées et non traitées, lorsque nous les récupérerons de notre modèle murin, afin de valider cette hypothèse.

Malheureusement, nous n'avons pas encore pu identifier de façon évidente le RD impliqué dans l'effet de nétrine-1 au sein des SS mais il semble cependant qu'UNC5-B soit un bon candidat. En effet, plusieurs RD de nétrine-1 sont exprimés dans les SS comme UNC5-A, UNC5-B ou encore Neo-1. Nous nous sommes plutôt intéressés au récepteur UNC5-B étant donné sa cinétique d'induction liée à celle de nétrine-1 dans les cancers et à l'absence de l'effet du NP137 en l'absence de ce récepteur [99], [100]. Ce choix est également appuyé sur la modulation de son expression par SS18-SSX que nous avons montré dans nos résultats ainsi que la perte de plasticité cellulaire lors de son KD. Cependant des tests fonctionnels *in vivo* sont encore nécessaires et seront réalisés sur notre modèle AB1167 greffé chez la souris.

2.2.3.2 Impact sur les cellules souches cancéreuses

Dans la première partie de ce manuscrit, nous avons vu que nétrine-1 jouait un rôle clé dans le maintien des CSCs mammaires et ovariennes et que ce rôle semble être retrouvé dans les SS. Cela est cohérent avec la littérature qui décrit ces sarcomes comme étant des tumeurs présentant des capacités souches [371]. Ainsi, des lignées cellulaires ont montré des capacités

à former des sphères de même que d'exprimer des marqueurs clés de l'identité des cellules souches tels que Oct 3/4, Nanog et Sox2. Par la suite d'autres marqueurs des cellules souches tels que CD133, CD271, CD344 ont été identifiés dans les SS [404].

Nous avons déjà montré dans notre modèle AB1167 que l'expression de SS18-SSX transforme les cellules et leur confère des propriétés souches comme notamment la capacité à former des sphères *in vitro* et nous sommes également en train d'investiguer leur capacité à former des tumeurs *in vivo*. Nous avons émis l'hypothèse que cet effet de SS18-SSX passe par l'expression de nétrine-1 et nous avons d'ailleurs montré qu'une diminution de l'expression de nétrine-1 dans le modèle AB1167-SS18-SSX2 induit une diminution de la capacité à former des sphères. Ces résultats suggèrent que nétrine-1 a bien un impact de nétrine-1 sur la plasticité cellulaire et potentiellement sur les CSCs des SS. L'analyse IHC des marqueurs des CSCs de SS sur les tumeurs murines traitées ou non au NP137 nous permettra de confirmer ces résultats. Nous avons également remarqué qu'à la suite de l'expression de SS18-SSX, les cellules AB1167 perdent leur capacité à se différencier et à former des myotubes. Ainsi, nous étudions actuellement si la diminution de l'expression de nétrine-1 et/ou UNC5-B restaure cette capacité.

Comme nous l'avons déjà évoqué plus haut, la voie YAP/TAZ régule entre autres le maintien des caractères souches et semble jouer un rôle non-négligeable dans les SS. De façon intéressante, une équipe chinoise a décrit dans les cancers gastriques que les capacités oncogéniques de nétrine-1 passeraient par l'induction d'une accumulation de YAP dans le noyau [96]. L'association des résultats de cette étude au rôle de nétrine-1 dans le maintien des caractères souches décrit en première partie de ce manuscrit met en lumière que la voie YAP/TAZ doit être étudiée de plus près dans ce contexte. Une hypothèse possible est que YAP/TAZ est une voie induite en aval de la fixation de nétrine-1 sur UNC5-B et impliquée dans un rôle de maintien des caractères souches induit par nétrine-1 dans les SS.

De plus, si notre hypothèse que la voie Wnt/ β -caténine joue un rôle dans l'expression de nétrine-1, compte tenu de l'intrication de ces deux voies dans les SS, il pourrait être intéressant d'étudier si nétrine-1 n'est pas impliquée dans la communication entre ces deux voies.

2.3 Perspectives thérapeutiques du NP137

Comme déjà mentionné dans la discussion de l'article, nous avons montré un rôle du NP137 dans la limitation de la croissance tumorale mais nous avons été surpris de ne pas voir d'effet synergique lorsqu'il est associé avec d'autres traitements et notamment la doxorubicine. Bien que faisant partie du traitement de référence pour les patients [249], [257], nous avons constaté une absence totale d'efficacité de cette dernière dans le modèle murin. L'ifosfamide est généralement associée à la doxorubicine dans la prise en charge thérapeutique et elle semble d'ailleurs plus efficace que la doxorubicine seule [405]. Par crainte que son efficacité ne masque l'effet du NP137, nous avons fait le choix d'utiliser uniquement la doxorubicine. Compte tenu de nos résultats, il pourrait cependant être intéressant de tester la combinaison du NP137 avec l'ifosfamide.

Avoir un autre modèle *in vivo* montrant l'effet du NP137 nous permettrait de solidifier nos résultats. L'absence de résultats sur les modèles de xénogreffe est décevante, cependant cela n'est pas forcément inquiétant compte-tenu des inconvénients de l'utilisation de lignées cellulaires qui ont déjà été évoqués. Il serait intéressant de pouvoir tester d'autres modèles mais nous n'avons pas d'autres lignées à ce jour.

Les *Xénogreffes Dérivées de Patients* (PDX) sont des modèles murins dans lesquels des fragments de tumeurs humaines fraîches sont greffés dans des souris immunodéficientes et qui présentent l'intérêt que l'hétérogénéité tumorale y est conservée. Tout comme pour les lignées cellulaires, les modèles PDX de SS disponibles sont peu nombreux en comparaison à d'autres cancers [406]. Cela s'explique par la rareté de ces tumeurs mais également par un niveau de succès des greffes parfois faible. Cependant, avec presque une vingtaine de modèles disponibles dans des banques internationales, ils représentent une option attrayante pour pouvoir tester le NP137 sur d'autres modèles et ainsi renforcer nos résultats.

Enfin, nous avons également mis en place une collaboration avec l'équipe du Dr Julien Ablain du CRCL pour essayer de développer un modèle de SS chez le zebrafish, toujours dans le but de pouvoir tester le NP137 dans d'autres modèles. Nous avons fait face à plusieurs écueils notamment à cause de la toxicité de SS18-SSX qui a entraîné une forte mortalité embryonnaire des poissons. Exprimé sous le contrôle d'un promoteur ubiquitaire, une forte dilution du plasmide induisant l'expression de la protéine a été nécessaire afin d'obtenir des poissons viables. Ces derniers ont par la suite développé de petites masses au niveau de la queue et une paralysie de la nageoire a été observée pour certains animaux. Nous sommes actuellement en train d'étudier l'histologie de ces masses afin de savoir s'il s'agit de tumeurs similaires aux SS.

Malgré la nécessité de renforcer nos résultats, le NP137 semble cependant bien être une thérapie intéressante dans la prise en charge des SS. Il pourrait être intéressant de tester ce potentiel thérapeutique dans d'autres sarcomes exprimant nétrine-1 tel que les sarcomes BCOR réarrangés dont nous avons précédemment parlé mais également les sarcomes pléomorphes dans lesquels de récents résultats indiquent que la présence de nétrine-1 est associée à une diminution de la survie globale et de la survie sans métastases dans une cohorte de 337 patients.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Au cours de mes travaux de thèse, j'ai pu mettre en évidence une association entre l'expression de nétrine-1 et une modulation de la plasticité cellulaire à travers deux exemples : celui des CSCs mammaires et ovariennes et celui des SS. Dans ces deux cas, il semble que la signalisation induite par la fixation de nétrine-1 sur son récepteur UNC5-B confère un avantage sélectif aux cellules en leur permettant d'acquérir des propriétés associées aux CSCs.

Comme nous l'avons vu dans le Chapitre 2, les notions de CSCs et de plasticité cellulaire sont étroitement intriquées, l'existence même des CSCs faisant débat au sein de la communauté scientifique. En effet plusieurs auteurs rapportent un état particulier des cellules, sans leur conférer de propriétés "souches," qu'elles acquièrent ou perdent de façon dynamique, sous le contrôle d'un large éventail de facteurs provenant notamment du microenvironnement tumoral. Si ce débat n'est peut-être que sémantique, il ne remet pas en cause un état hybride, d'une grande plasticité, permettant aux cellules de changer leurs propriétés de façon rapide et efficace. L'objet de cette thèse n'est pas de débattre sur l'existence ou non des CSCs, qu'il s'agisse d'une population cellulaire définie ou d'un état transitoire particulier, les propriétés d'auto-renouvellement et de résistance aux traitements associées sont, elles, bien avérées et représentent l'un des challenges thérapeutiques majeur dans les traitements contre les cancers. Nous avons montré, dans des pathologies relativement différentes, que la voie de signalisation de nétrine-1 et de son récepteur UNC5-B est essentielle à l'acquisition d'un phénotype similaire associé aux propriétés dites souches et donc à la plasticité cellulaire.

Comme il a été présenté dans le Chapitre 1 de ce manuscrit, nétrine-1 est une molécule du développement qui n'est normalement que peu voire pas exprimée chez l'adulte. Les mécanismes par lesquels son expression est rétablie dans les cancers sont encore majoritairement inconnus. Cependant, nos résultats dans le contexte des SS ont mis en lumière que des régulations épigénétiques étaient vraisemblablement impliquées dans cette réexpression, au moins dans cette pathologie. Il est en effet assez logique que des modifications épigénétiques, et notamment des modifications post-traductionnelles des queues d'histones soient liées à des événements hybrides à grande plasticité qui doivent pouvoir être facilement modulés en fonction de l'environnement.

Il est intéressant de comprendre pourquoi la réexpression du couple netrine-1/UNC5-B est sélectionnée pour conférer un avantage aux tumeurs. A l'issue de cette réexpression il est normal de supposer que les voies modulées par nétrine-1 sont similaires voir identiques à celles qu'elle médie au cours du développement. Cette réexpression d'un facteur de guidage axonal dans les cancers n'est d'ailleurs pas propre à nétrine-1. En effet, les protéines Slits sont des protéines initialement décrites comme des facteurs de guidage axonal capables de se fixer sur leur récepteur Robo qui se trouve également être exprimées dans les cancers [407].

Plusieurs gènes, protéines et voies de signalisation requises au cours du développement embryonnaire ont montré un potentiel de régulation du développement et de la progression tumorale en jouant un rôle important dans le contournement des mécanismes anti-tumoraux mis en place par les cellules. L'un des mécanismes médiés par les protéines de guidage qui pourrait conférer un avantage aux tumeurs dans les cancers serait la migration cellulaire voir l'invasion et la survie conférée aux cellules.

Compte tenu de son rôle en tant que ligand des RDs, nétrine-1 possède également un rôle dans la survie des cellules tumorales en empêchant l'activation de la voie négative de ses récepteurs, rôle important pour une mise en place précise du système nerveux voir de tous les organes dits "branchés" mis en place à l'aide de nétrine-1, au cours du développement [43]

Très récemment, Lengrand *et al.* ont étudié le niveau d'expression des signatures Hallmark au sein de tumeurs murines cutanées, traitées ou non avec l'anticorps anti-nétrine-1 NP137, permettant ainsi de mettre en évidence les mécanismes dans lesquels nétrine-1 est impliquée au sein des tumeurs. De façon reproductible, une diminution des signatures de l'EMT, l'hypoxie, l'angiogenèse et de la réponse inflammatoire plus globale a été constatée nous apportant ainsi des informations sur les voies mises en jeu par le signal médié par le couple Netrin-1/UNC5-B, qu'il serait intéressant d'aller explorer dans nos modèles [99].

Ainsi, comme nous l'avons présenté dans le Chapitre 2, l'EMT est intimement liée à la plasticité cellulaire et au maintien des caractères souches dans les tumeurs. La plasticité cellulaire médiée par l'EMT permet également la régulation de la migration cellulaire via l'acquisition de phénotypes transitoires entre un état épithélial et mésenchymateux. Sa diminution lors du traitement au NP137 est donc le signe d'une baisse de la plasticité cellulaire initialement médiée par nétrine-1. Cette-dernière joue un rôle dans la migration cellulaire et son expression par les cellules aux propriétés souches pourrait être un avantage considérable par rapport aux cellules qui ne l'expriment pas.

De même que pour l'EMT, l'hypoxie joue un rôle important dans le maintien des propriétés souches via son principal médiateur HIF-1 α [408]. Ce dernier induit la transcription de nombreux gènes favorisant entre autres la prolifération et la survie cellulaire mais également le maintien des propriétés souches. Une induction de l'expression de nétrine-1 par l'hypoxie a déjà été décrite dans la littérature [98], [107], [109]. Bien que le rôle de nétrine-1 dans la modulation de cette voie ne soit pas décrite dans la littérature, son rôle pourrait être essentiel, et mériterait d'être exploré compte tenu également de l'importance de l'hypoxie dans le processus tumoral et la néo-angiogenèse associée. De plus, les CSCs sont également essentielles à l'angiogenèse tumorale, de nombreux travaux ayant montré que la surexpression de marqueurs à caractères souches embryonnaires tel que OCT4 est associée à l'angiogenèse [409] Le couple nétrine-1/UNC5-B est également de nombreuses fois décrit pour être aussi impliqué dans l'angiogenèse [374] expliquant aisément que cette voie soit réduite en l'absence de nétrine-1 par le NP137. L'ensemble de ces résultats pourrait permettre d'explorer ces voies de signalisation en lien avec nétrine-1 dans les cellules tumorales présentant des propriétés souches.

Enfin, le rôle de nétrine-1 comme molécule pro-inflammatoire est de plus en plus évident comme présenté dans le chapitre 1 et confirmé par les résultats de Lengrand *et al* [99]. Comme nous l'avons montré, les CSCs font partie des principales cellules productrices de nétrine-1 et leur maintien est donc essentiel pour le maintien d'une réponse inflammatoire propre au cancer.

Au sein du microenvironnement tumoral, les fibroblastes associés au cancer (CAFs) ont également été décrits comme des cellules productrices de nétrine-1. Des travaux au laboratoire ont d'ailleurs montré qu'ils sont essentiels pour le maintien du caractère souche des CSCs via une production d'IL-6 induite par la fixation de nétrine-1 sur les récepteurs UNC5-B à leur surface. Le rôle de modulation des cytokines du microenvironnement tumoral par nétrine-1 ne s'arrête pas là. En effet, la littérature rapporte que nétrine-1 permet le recrutement d'autres cellules immunitaires comme par exemple les macrophages ou encore les PMN-MDSCs comme nous l'avons montré dans le premier article de la partie "Résultats". Ainsi, la présence ou l'absence de nétrine-1 dans le microenvironnement tumoral change probablement de façon directe et/ou indirecte son environnement cytokinique.

Enfin, les travaux récents de l'équipe du Dr Fabrice Laval ont montré un rôle de nétrine-1 dans le maintien de la pluripotence des mESCs via les récepteurs Neo-1 et UNC5-B

qui co-régulent les voies Wnt et MAPK [83]. Bien que des expériences complémentaires soient nécessaires pour valider ce mécanisme dans les cellules cancéreuses présentant des propriétés souches, cela permettrait d'expliquer l'avantage sélectif conféré par la voie nétrine-1/UNC5-B aux tumeurs. Ainsi, nétrine-1 produite par les CSCs (ou par les CAFs) se fixerait sur les récepteurs UNC5-B se trouvant à la surface, entretenant alors le maintien des caractères souches et de ses propriétés associées.

En conclusion, nétrine-1 est une molécule très pléiotrope ce qui pourrait rendre compte d'une grande capacité à permettre aux cellules tumorales d'utiliser de nombreuses voies par son intermédiaire afin de s'adapter dans un environnement complexe et permettre ainsi l'initiation d'une tumeur hétérogène. L'analyse des prélèvements humains des tumeurs traitées et non traitées obtenue à l'issue des différents essais cliniques avec le NP137, en cours dans les cancers gynécologiques et à venir dans les sarcomes, nous permettrons de mieux comprendre le rôle complexe de nétrine-1 chez l'Homme.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] C. Delloye-Bourgeois *et al.*, « Nucleolar Localization of a Netrin-1 Isoform Enhances Tumor Cell Proliferation », *Science signaling*, vol. 5, p. ra57, août 2012, doi: 10.1126/scisignal.2002456.
- [2] S. Rajasekharan et T. E. Kennedy, « The netrin protein family », *Genome Biology*, vol. 10, n° 9, p. 239, sept. 2009, doi: 10.1186/gb-2009-10-9-239.
- [3] M. Bellina et A. Bernet, « La nétrine-1, une nouvelle cible antitumorale », *Med Sci (Paris)*, vol. 38, n° 4, p. 351-358, avr. 2022, doi: 10.1051/medsci/2022038.
- [4] T. Serafini, T. E. Kennedy, M. J. Gaiko, C. Mirzayan, T. M. Jessell, et M. Tessier-Lavigne, « The netrins define a family of axon outgrowth-promoting proteins homologous to *C. elegans* UNC-6 », *Cell*, vol. 78, n° 3, p. 409-424, août 1994, doi: 10.1016/0092-8674(94)90420-0.
- [5] J. de Wit et J. Verhaagen, « Proteoglycans as modulators of axon guidance cue function », *Adv Exp Med Biol*, vol. 600, p. 73-89, 2007, doi: 10.1007/978-0-387-70956-7_7.
- [6] V. Cirulli et M. Yebra, « Netrins: beyond the brain », *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 8, n° 4, Art. n° 4, avr. 2007, doi: 10.1038/nrm2142.
- [7] E. D. Leonardo, L. Hinck, M. Masu, K. Keino-Masu, S. L. Ackerman, et M. Tessier-Lavigne, « Vertebrate homologues of *C. elegans* UNC-5 are candidate netrin receptors », *Nature*, vol. 386, n° 6627, Art. n° 6627, avr. 1997, doi: 10.1038/386833a0.
- [8] M. Grandin *et al.*, « Structural Decoding of the Netrin-1/UNC5 Interaction and its Therapeutical Implications in Cancers », *Cancer Cell*, vol. 29, n° 2, p. 173-185, févr. 2016, doi: 10.1016/j.ccell.2016.01.001.
- [9] H. Wang, N. G. Copeland, D. J. Gilbert, N. A. Jenkins, et M. Tessier-Lavigne, « Netrin-3, a Mouse Homolog of Human NTN2L, Is Highly Expressed in Sensory Ganglia and Shows Differential Binding to Netrin Receptors », *J Neurosci*, vol. 19, n° 12, p. 4938-4947, juin 1999, doi: 10.1523/JNEUROSCI.19-12-04938.1999.
- [10] A. W. Koch *et al.*, « Robo4 maintains vessel integrity and inhibits angiogenesis by interacting with UNC5B », *Dev Cell*, vol. 20, n° 1, p. 33-46, janv. 2011, doi: 10.1016/j.devcel.2010.12.001.
- [11] G. Ahmed *et al.*, « Draxin Inhibits Axonal Outgrowth through the Netrin Receptor DCC », *J. Neurosci.*, vol. 31, n° 39, p. 14018-14023, sept. 2011, doi: 10.1523/JNEUROSCI.0943-11.2011.
- [12] S. Yamagishi *et al.*, « FLRT2 and FLRT3 act as repulsive guidance cues for Unc5-positive neurons », *The EMBO Journal*, vol. 30, n° 14, p. 2920-2933, juill. 2011, doi: 10.1038/emboj.2011.189.
- [13] E. R. Fearon et B. Vogelstein, « A genetic model for colorectal tumorigenesis », *Cell*, vol. 61, n° 5, p. 759-767, juin 1990, doi: 10.1016/0092-8674(90)90186-l.
- [14] S. A. Colamarino et M. Tessier-Lavigne, « The axonal chemoattractant netrin-1 is also a chemorepellent for trochlear motor axons », *Cell*, vol. 81, n° 4, p. 621-629, mai 1995, doi: 10.1016/0092-8674(95)90083-7.
- [15] K. Keino-Masu *et al.*, « Deleted in Colorectal Cancer (DCC) Encodes a Netrin Receptor », *Cell*, vol. 87, n° 2, p. 175-185, oct. 1996, doi: 10.1016/S0092-8674(00)81336-7.
- [16] M. S. Deiner, T. E. Kennedy, A. Fazeli, T. Serafini, M. Tessier-Lavigne, et D. W. Sretavan, « Netrin-1 and DCC mediate axon guidance locally at the optic disc: loss of function leads to optic nerve hypoplasia », *Neuron*, vol. 19, n° 3, p. 575-589, sept. 1997, doi: 10.1016/s0896-6273(00)80373-6.
- [17] Y.-Q. Ding, J.-Y. Kim, Y.-S. Xu, Y. Rao, et Z.-F. Chen, « Ventral migration of early-born neurons requires Dcc and is essential for the projections of primary afferents in the spinal

- cord », *Development*, vol. 132, n° 9, p. 2047-2056, mai 2005, doi: 10.1242/dev.01798.
- [18] H. J. Junge, A. R. Yung, L. V. Goodrich, et Z. Chen, « Netrin1/DCC signaling promotes neuronal migration in the dorsal spinal cord », *Neural Development*, vol. 11, n° 1, p. 19, oct. 2016, doi: 10.1186/s13064-016-0074-x.
- [19] J. S. Goldman *et al.*, « Netrin-1 promotes excitatory synaptogenesis between cortical neurons by initiating synapse assembly », *J Neurosci*, vol. 33, n° 44, p. 17278-17289, oct. 2013, doi: 10.1523/JNEUROSCI.1085-13.2013.
- [20] K. Löw, M. Culbertson, F. Bradke, M. Tessier-Lavigne, et M. H. Tuszynski, « Netrin-1 Is a Novel Myelin-Associated Inhibitor to Axon Growth », *J Neurosci*, vol. 28, n° 5, p. 1099-1108, janv. 2008, doi: 10.1523/JNEUROSCI.4906-07.2008.
- [21] J. M. Gad, S. L. Keeling, T. Shu, L. J. Richards, et H. M. Cooper, « The Spatial and Temporal Expression Patterns of Netrin Receptors, DCC and Neogenin, in the Developing Mouse Retina », *Experimental Eye Research*, vol. 70, n° 6, p. 711-722, juin 2000, doi: 10.1006/exer.2000.0823.
- [22] T. Shu, K. M. Valentino, C. Seaman, H. M. Cooper, et L. J. Richards, « Expression of the Netrin-1 receptor, deleted in colorectal cancer (DCC), is largely confined to projecting neurons in the developing forebrain », *Journal of Comparative Neurology*, vol. 416, n° 2, p. 201-212, 2000, doi: 10.1002/(SICI)1096-9861(200011)416:2<201::AID-CNE6>3.0.CO;2-Z.
- [23] L. Hedrick, K. R. Cho, E. R. Fearon, T. C. Wu, K. W. Kinzler, et B. Vogelstein, « The DCC gene product in cellular differentiation and colorectal tumorigenesis », *Genes Dev*, vol. 8, n° 10, p. 1174-1183, mai 1994, doi: 10.1101/gad.8.10.1174.
- [24] L. I. Finci *et al.*, « The crystal structure of netrin-1 in complex with DCC reveals the bifunctionality of netrin-1 as a guidance cue », *Neuron*, vol. 83, n° 4, p. 839-849, août 2014, doi: 10.1016/j.neuron.2014.07.010.
- [25] E. Stein, Y. Zou, M. Poo, et M. Tessier-Lavigne, « Binding of DCC by Netrin-1 to Mediate Axon Guidance Independent of Adenosine A2B Receptor Activation », *Science*, vol. 291, n° 5510, p. 1976-1982, mars 2001, doi: 10.1126/science.1059391.
- [26] S. Qin, L. Yu, Y. Gao, R. Zhou, et C. Zhang, « Characterization of the receptors for axon guidance factor netrin-4 and identification of the binding domains », *Molecular and Cellular Neuroscience*, vol. 34, n° 2, p. 243-250, févr. 2007, doi: 10.1016/j.mcn.2006.11.002.
- [27] P. C. G. Haddick *et al.*, « Defining the ligand specificity of the deleted in colorectal cancer (DCC) receptor », *PLoS One*, vol. 9, n° 1, p. e84823, 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0084823.
- [28] J. Vielmetter, J. F. Kayyem, J. M. Roman, et W. J. Dreyer, « Neogenin, an avian cell surface protein expressed during terminal neuronal differentiation, is closely related to the human tumor suppressor molecule deleted in colorectal cancer », *J Cell Biol*, vol. 127, n° 6 Pt 2, p. 2009-2020, déc. 1994, doi: 10.1083/jcb.127.6.2009.
- [29] E. Matsunaga et A. Chédotal, « Repulsive guidance molecule/neogenin: a novel ligand-receptor system playing multiple roles in neural development », *Development, Growth & Differentiation*, vol. 46, n° 6, p. 481-486, 2004, doi: 10.1111/j.1440-169x.2004.00768.x.
- [30] R. A. Robinson *et al.*, « Simultaneous binding of Guidance Cues NET1 and RGM blocks extracellular NEO1 signaling », *Cell*, vol. 184, n° 8, p. 2103-2120.e31, avr. 2021, doi: 10.1016/j.cell.2021.02.045.
- [31] I. Feoktistov et I. Biaggioni, « Adenosine A2B Receptors », *Pharmacol Rev*, vol. 49, n° 4, p. 381-402, déc. 1997.
- [32] V. Corset, K. T. Nguyen-Ba-Charvet, C. Forcet, E. Moyse, A. Chédotal, et P. Mehlen, « Netrin-1-mediated axon outgrowth and cAMP production requires interaction with

- adenosine A2b receptor », *Nature*, vol. 407, n° 6805, Art. n° 6805, oct. 2000, doi: 10.1038/35037600.
- [33] W. L. McKenna, C. Wong-Staal, G. C. Kim, H. Macias, L. Hinck, et J. L. Bartoe, « Netrin-1-independent adenosine A2b receptor activation regulates the response of axons to netrin-1 by controlling cell surface levels of UNC5A receptors », *Journal of Neurochemistry*, vol. 104, n° 4, p. 1081-1090, 2008, doi: 10.1111/j.1471-4159.2007.05040.x.
- [34] V. Mirakaj, D. Gatidou, C. Pötzsch, K. König, et P. Rosenberger, « Netrin-1 Signaling Dampens Inflammatory Peritonitis », *The Journal of Immunology*, vol. 186, n° 1, p. 549-555, janv. 2011, doi: 10.4049/jimmunol.1002671.
- [35] A. Ly, A. Nikolaev, G. Suresh, Y. Zheng, M. Tessier-Lavigne, et E. Stein, « DSCAM is a netrin receptor that collaborates with DCC in mediating turning responses to netrin-1 », *Cell*, vol. 133, n° 7, p. 1241-1254, juin 2008, doi: 10.1016/j.cell.2008.05.030.
- [36] G. L. Andrews *et al.*, « Dscam Guides Embryonic Axons By Netrin-Dependent And Independent Functions », *Development*, vol. 135, n° 23, p. 3839-3848, déc. 2008, doi: 10.1242/dev.023739.
- [37] G. Liu *et al.*, « DSCAM functions as a netrin receptor in commissural axon pathfinding », *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 106, n° 8, p. 2951-2956, févr. 2009, doi: 10.1073/pnas.0811083106.
- [38] E. Palmesino, P. C. G. Haddick, M. Tessier-Lavigne, et A. Kania, « Genetic Analysis of DSCAM's Role as a Netrin-1 Receptor in Vertebrates », *J Neurosci*, vol. 32, n° 2, p. 411-416, janv. 2012, doi: 10.1523/JNEUROSCI.3563-11.2012.
- [39] T. Jiang *et al.*, « CD146 is a coreceptor for VEGFR-2 in tumor angiogenesis », *Blood*, vol. 120, n° 11, p. 2330-2339, sept. 2012, doi: 10.1182/blood-2012-01-406108.
- [40] A. S. Leroyer, M. G. Blin, R. Bachelier, N. Bardin, M. Blot-Chaubaud, et F. Dignat-George, « CD146 (Cluster of Differentiation 146) », *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, vol. 39, n° 6, p. 1026-1033, juin 2019, doi: 10.1161/ATVBAHA.119.312653.
- [41] T. Tu *et al.*, « CD146 acts as a novel receptor for netrin-1 in promoting angiogenesis and vascular development », *Cell research*, vol. 25, févr. 2015, doi: 10.1038/cr.2015.15.
- [42] N. Rama, D. Goldschneider, V. Corset, J. Lambert, L. Pays, et P. Mehlen, « Amyloid Precursor Protein Regulates Netrin-1-mediated Commissural Axon Outgrowth * », *Journal of Biological Chemistry*, vol. 287, n° 35, p. 30014-30023, août 2012, doi: 10.1074/jbc.M111.324780.
- [43] M. Yebra *et al.*, « Recognition of the Neural Chemoattractant Netrin-1 by Integrins $\alpha 6\beta 4$ and $\alpha 3\beta 1$ Regulates Epithelial Cell Adhesion and Migration », *Developmental Cell*, vol. 5, n° 5, p. 695-707, nov. 2003, doi: 10.1016/S1534-5807(03)00330-7.
- [44] P. Mehlen, S. Rabizadeh, S. J. Snipas, N. Assa-Munt, G. S. Salvesen, et D. E. Bredesen, « The DCC gene product induces apoptosis by a mechanism requiring receptor proteolysis », *Nature*, vol. 395, n° 6704, Art. n° 6704, oct. 1998, doi: 10.1038/27441.
- [45] F. Llambi, F. Causeret, E. Bloch-Gallego, et P. Mehlen, « Netrin-1 acts as a survival factor via its receptors UNC5H and DCC », *EMBO J*, vol. 20, n° 11, p. 2715-2722, juin 2001, doi: 10.1093/emboj/20.11.2715.
- [46] H. Arakawa, « Netrin-1 and its receptors in tumorigenesis », *Nat Rev Cancer*, vol. 4, n° 12, p. 978-987, déc. 2004, doi: 10.1038/nrc1504.
- [47] E. Matsunaga *et al.*, « RGM and its receptor neogenin regulate neuronal survival. », *Nature Cell Biology*, vol. 6, p. 749, 2004, doi: 10.1038/ncb1157.
- [48] C. Thibert, M.-A. Teillet, F. Lapointe, L. Mazelin, N. M. Le Douarin, et P. Mehlen, « Inhibition of neuroepithelial patched-induced apoptosis by sonic hedgehog », *Science*, vol.

- 301, n° 5634, p. 843-846, août 2003, doi: 10.1126/science.1085405.
- [49] C. Delloye-Bourgeois *et al.*, « Sonic Hedgehog Promotes Tumor Cell Survival by Inhibiting CDON Pro-Apoptotic Activity », *PLoS Biol*, vol. 11, n° 8, p. e1001623, août 2013, doi: 10.1371/journal.pbio.1001623.
- [50] S. Rabizadeh *et al.*, « Induction of apoptosis by the low-affinity NGF receptor », *Science*, vol. 261, n° 5119, p. 345-348, juill. 1993, doi: 10.1126/science.8332899.
- [51] M. C. Bordeaux *et al.*, « The RET proto-oncogene induces apoptosis: a novel mechanism for Hirschsprung disease », *EMBO J*, vol. 19, n° 15, p. 4056-4063, août 2000, doi: 10.1093/emboj/19.15.4056.
- [52] S. Tauszig-Delamasure *et al.*, « The TrkC receptor induces apoptosis when the dependence receptor notion meets the neurotrophin paradigm », *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 104, n° 33, p. 13361-13366, août 2007, doi: 10.1073/pnas.0701243104.
- [53] V. Nikolettoulou *et al.*, « Neurotrophin receptors TrkA and TrkC cause neuronal death whereas TrkB does not », *Nature*, vol. 467, n° 7311, Art. n° 7311, sept. 2010, doi: 10.1038/nature09336.
- [54] C. Furne *et al.*, « EphrinB3 is an Anti-apoptotic Ligand that Inhibits the Dependence Receptor Functions of EphA4 Receptors during adult neurogenesis », *Biochim Biophys Acta*, vol. 1793, n° 2, p. 231-238, févr. 2009, doi: 10.1016/j.bbamcr.2008.09.009.
- [55] D. Tulasne *et al.*, « Proapoptotic Function of the MET Tyrosine Kinase Receptor through Caspase Cleavage », *Mol Cell Biol*, vol. 24, n° 23, p. 10328-10339, déc. 2004, doi: 10.1128/MCB.24.23.10328-10339.2004.
- [56] H. Wang *et al.*, « The Proto-oncogene c-Kit Inhibits Tumor Growth by Behaving as a Dependence Receptor », *Molecular Cell*, vol. 72, n° 3, p. 413-425.e5, nov. 2018, doi: 10.1016/j.molcel.2018.08.040.
- [57] J. Luchino *et al.*, « Semaphorin 3E suppresses tumor cell death triggered by the plexin D1 dependence receptor in metastatic breast cancers », *Cancer Cell*, vol. 24, n° 5, p. 673-685, nov. 2013, doi: 10.1016/j.ccr.2013.09.010.
- [58] D. G. Stupack, X. S. Puente, S. Boutsaboualoy, C. M. Storgard, et D. A. Cheresh, « Apoptosis of adherent cells by recruitment of caspase-8 to unligated integrins », *J Cell Biol*, vol. 155, n° 3, p. 459-470, oct. 2001, doi: 10.1083/jcb.200106070.
- [59] F. Causeret, I. Sumia, et A. Pierani, « Kremen1 and Dickkopf1 control cell survival in a Wnt-independent manner », *Cell Death Differ*, vol. 23, n° 2, Art. n° 2, févr. 2016, doi: 10.1038/cdd.2015.100.
- [60] S. Lin *et al.*, « Non-canonical NOTCH3 signalling limits tumour angiogenesis », *Nat Commun*, vol. 8, n° 1, Art. n° 1, juill. 2017, doi: 10.1038/ncomms16074.
- [61] A.-M. Negulescu et P. Mehlen, « Dependence receptors – the dark side awakens », *The FEBS Journal*, vol. 285, n° 21, p. 3909-3924, 2018, doi: 10.1111/febs.14507.
- [62] F. Mille *et al.*, « Interfering with multimerization of netrin-1 receptors triggers tumor cell death », *Cell Death Differ*, vol. 16, n° 10, p. 1344-1351, oct. 2009, doi: 10.1038/cdd.2009.75.
- [63] C. Furne, V. Corset, Z. Hérincs, N. Cahuzac, A.-O. Hueber, et P. Mehlen, « The dependence receptor DCC requires lipid raft localization for cell death signaling », *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 103, n° 11, p. 4128-4133, mars 2006, doi: 10.1073/pnas.0507864103.
- [64] Z. Hérincs *et al.*, « DCC association with lipid rafts is required for netrin-1-mediated axon guidance », *J Cell Sci*, vol. 118, n° Pt 8, p. 1687-1692, avr. 2005, doi: 10.1242/jcs.02296.
- [65] C. Maise *et al.*, « Lipid raft localization and palmitoylation: Identification of two

requirements for cell death induction by the tumor suppressors UNC5H », *Experimental Cell Research*, vol. 314, n° 14, p. 2544-2552, août 2008, doi: 10.1016/j.yexcr.2008.06.001.

[66] M. Hernaiz-Llorens *et al.*, « Growth cone repulsion to Netrin-1 depends on lipid raft microdomains enriched in UNC5 receptors », *Cell Mol Life Sci*, vol. 78, n° 6, p. 2797-2820, 2021, doi: 10.1007/s00018-020-03663-z.

[67] R. Wang *et al.*, « Autoinhibition of UNC5b Revealed by the Cytoplasmic Domain Structure of the Receptor », *Molecular Cell*, vol. 33, n° 6, p. 692-703, mars 2009, doi: 10.1016/j.molcel.2009.02.016.

[68] F. Llambi *et al.*, « The dependence receptor UNC5H2 mediates apoptosis through DAP-kinase », *The EMBO journal*, vol. 24, p. 1192-201, avr. 2005, doi: 10.1038/sj.emboj.7600584.

[69] C. Guenebeaud *et al.*, « The Dependence Receptor UNC5H2/B Triggers Apoptosis via PP2A-Mediated Dephosphorylation of DAP Kinase », *Molecular Cell*, vol. 40, n° 6, p. 863-876, déc. 2010, doi: 10.1016/j.molcel.2010.11.021.

[70] A. Manceau, « Identification des voies de signalisations impliquées dans l'activité pro-apoptotique du récepteur à dépendance UNC5B ».

[71] C. Forcet *et al.*, « The dependence receptor DCC (deleted in colorectal cancer) defines an alternative mechanism for caspase activation », *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 98, n° 6, p. 3416-3421, mars 2001, doi: 10.1073/pnas.051378298.

[72] M. W. Boudreau, J. Peh, et P. J. Hergenrother, « Pro-caspase-3 Overexpression in Cancer: A Paradoxical Observation with Therapeutic Potential », *ACS Chem Biol*, vol. 14, n° 11, p. 2335-2348, nov. 2019, doi: 10.1021/acscchembio.9b00338.

[73] J. Liu *et al.*, « Mediation of the DCC Apoptotic Signal by DIP13 α * », *Journal of Biological Chemistry*, vol. 277, n° 29, p. 26281-26285, juill. 2002, doi: 10.1074/jbc.M204679200.

[74] A. B. Huber, A. L. Kolodkin, D. D. Ginty, et J.-F. Cloutier, « SIGNALING AT THE GROWTH CONE : Ligand-Receptor Complexes and the Control of Axon Growth and Guidance », *Annu. Rev. Neurosci.*, vol. 26, n° 1, p. 509-563, mars 2003, doi: 10.1146/annurev.neuro.26.010302.081139.

[75] N. P. Boyer et S. L. Gupton, « Revisiting Netrin-1: One Who Guides (Axons) », *Front. Cell. Neurosci.*, vol. 12, p. 221, juill. 2018, doi: 10.3389/fncel.2018.00221.

[76] C. Dominici *et al.*, « Floor-plate-derived netrin-1 is dispensable for commissural axon guidance », *Nature*, vol. 545, n° 7654, Art. n° 7654, mai 2017, doi: 10.1038/nature22331.

[77] S. G. Varadarajan *et al.*, « Netrin1 Produced by Neural Progenitors, Not Floor Plate Cells, Is Required for Axon Guidance in the Spinal Cord », *Neuron*, vol. 94, n° 4, p. 790-799.e3, mai 2017, doi: 10.1016/j.neuron.2017.03.007.

[78] K. Yamauchi *et al.*, « Netrin-1 Derived from the Ventricular Zone, but not the Floor Plate, Directs Hindbrain Commissural Axons to the Ventral Midline », *Sci Rep*, vol. 7, n° 1, Art. n° 1, sept. 2017, doi: 10.1038/s41598-017-12269-8.

[79] R. Meijers, R. G. Smock, Y. Zhang, et J.-H. Wang, « Netrin Synergizes Signaling and Adhesion through DCC », *Trends in Biochemical Sciences*, vol. 45, n° 1, p. 6-12, janv. 2020, doi: 10.1016/j.tibs.2019.10.005.

[80] Y. Liu *et al.*, « Novel Role for Netrins in Regulating Epithelial Behavior during Lung Branching Morphogenesis », *Curr Biol*, vol. 14, n° 10, p. 897-905, mai 2004, doi: 10.1016/j.cub.2004.05.020.

[81] K. Srinivasan, P. Strickland, A. Valdes, G. C. Shin, et L. Hinck, « Netrin-1/neogenin interaction stabilizes multipotent progenitor cap cells during mammary gland morphogenesis », *Dev Cell*, vol. 4, n° 3, p. 371-382, mars 2003, doi: 10.1016/s1534-5807(03)00054-6.

- [82] D. Ozmadenci *et al.*, « Netrin-1 regulates somatic cell reprogramming and pluripotency maintenance », *Nat Commun*, vol. 6, n° 1, p. 7398, nov. 2015, doi: 10.1038/ncomms8398.
- [83] A. Huyghe *et al.*, « Netrin-1 promotes naive pluripotency through Neo1 and Unc5b co-regulation of Wnt and MAPK signalling », *Nat Cell Biol*, vol. 22, n° 4, p. 389-400, avr. 2020, doi: 10.1038/s41556-020-0483-2.
- [84] M. Grandin *et al.*, « Inhibition of DNA methylation promotes breast tumor sensitivity to netrin-1 interference », *EMBO Mol Med*, vol. 8, n° 8, p. 863-877, août 2016, doi: 10.15252/emmm.201505945.
- [85] A. D. Papanastasiou, G. Pampalakis, D. Katsaros, et G. Sotiropoulou, « Netrin-1 overexpression is predictive of ovarian malignancies », *Oncotarget*, vol. 2, n° 5, p. 363-367, mai 2011, doi: 10.18632/oncotarget.258.
- [86] S. Kaufmann, S. Kuphal, T. Schubert, et A. K. Bosserhoff, « Functional Implication of Netrin Expression in Malignant Melanoma », *Cell Oncol*, vol. 31, n° 6, p. 415-422, 2009, doi: 10.3233/CLO-2009-0491.
- [87] T. Sanvoranart *et al.*, « Targeting Netrin-1 in glioblastoma stem-like cells inhibits growth, invasion, and angiogenesis », *Tumor Biol.*, vol. 37, n° 11, p. 14949-14960, nov. 2016, doi: 10.1007/s13277-016-5314-5.
- [88] P. N. Harter *et al.*, « Netrin-1 expression is an independent prognostic factor for poor patient survival in brain metastases », *PLoS One*, vol. 9, n° 3, p. e92311, 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0092311.
- [89] C. Delloye-Bourgeois *et al.*, « Netrin-1 acts as a survival factor for aggressive neuroblastoma », *J Exp Med*, vol. 206, n° 4, p. 833-847, avr. 2009, doi: 10.1084/jem.20082299.
- [90] T. Akino *et al.*, « Netrin-1 promotes medulloblastoma cell invasiveness and angiogenesis, and demonstrates elevated expression in tumor tissue and urine of patients with pediatric medulloblastoma », *Cancer Res*, vol. 74, n° 14, p. 3716-3726, juill. 2014, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-3116.
- [91] C. Delloye-Bourgeois *et al.*, « Interference with netrin-1 and tumor cell death in non-small cell lung cancer », *J Natl Cancer Inst*, vol. 101, n° 4, p. 237-247, févr. 2009, doi: 10.1093/jnci/djn491.
- [92] G. Ramesh, A. Berg, et C. Jayakumar, « Plasma netrin-1 is a diagnostic biomarker of human cancers », *Biomarkers*, vol. 16, n° 2, p. 172-180, mars 2011, doi: 10.3109/1354750X.2010.541564.
- [93] B.-C. Link *et al.*, « Prognostic Implications of Netrin-1 Expression and Its Receptors in Patients with Adenocarcinoma of the Pancreas », *Ann Surg Oncol*, vol. 14, n° 9, p. 2591-2599, sept. 2007, doi: 10.1245/s10434-007-9469-6.
- [94] U. Kefeli *et al.*, « Netrin-1 concentrations in patients with advanced gastric cancer and its relation with treatment », *Biomarkers*, vol. 17, n° 7, p. 663-667, nov. 2012, doi: 10.3109/1354750X.2012.709882.
- [95] A. Paradisi *et al.*, « Netrin-1 up-regulation in inflammatory bowel diseases is required for colorectal cancer progression », *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 106, n° 40, p. 17146-17151, oct. 2009, doi: 10.1073/pnas.0901767106.
- [96] K. Yin *et al.*, « Netrin-1 promotes metastasis of gastric cancer by regulating YAP activity », *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 496, n° 1, p. 76-82, janv. 2018, doi: 10.1016/j.bbrc.2017.12.170.
- [97] L. Broutier *et al.*, « Targeting netrin-1/DCC interaction in diffuse large B-cell and mantle cell lymphomas », *EMBO Mol Med*, vol. 8, n° 2, p. 96-104, févr. 2016, doi: 10.15252/emmm.201505480.

- [98] H. Chen, Q. Chen, et Q. Luo, « Expression of netrin-1 by hypoxia contributes to the invasion and migration of prostate carcinoma cells by regulating YAP activity », *Experimental Cell Research*, vol. 349, n° 2, p. 302-309, déc. 2016, doi: 10.1016/j.yexcr.2016.10.023.
- [99] J. Lengrand *et al.*, « Pharmacological targeting of netrin-1 inhibits EMT in cancer », *Nature*, vol. 620, n° 7973, Art. n° 7973, août 2023, doi: 10.1038/s41586-023-06372-2.
- [100] P. A. Cassier *et al.*, « Netrin-1 blockade inhibits tumour growth and EMT features in endometrial cancer », *Nature*, vol. 620, n° 7973, p. 409-416, 2023, doi: 10.1038/s41586-023-06367-z.
- [101] A. Dongre et R. A. Weinberg, « New insights into the mechanisms of epithelial–mesenchymal transition and implications for cancer », *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 20, n° 2, Art. n° 2, févr. 2019, doi: 10.1038/s41580-018-0080-4.
- [102] V. Mirakaj et P. Rosenberger, « Immunomodulatory Functions of Neuronal Guidance Proteins », *Trends in Immunology*, vol. 38, n° 6, p. 444-456, juin 2017, doi: 10.1016/j.it.2017.03.007.
- [103] P. Ranganathan, R. Mohamed, C. Jayakumar, et G. Ramesh, « Guidance cue netrin-1 and the regulation of inflammation in acute and chronic kidney disease », *Mediators Inflamm*, vol. 2014, p. 525891, 2014, doi: 10.1155/2014/525891.
- [104] X. Mao *et al.*, « Netrin-1 Attenuates Cardiac Ischemia Reperfusion Injury and Generates Alternatively Activated Macrophages », *Inflammation*, vol. 37, n° 2, p. 573-580, avr. 2014, doi: 10.1007/s10753-013-9771-3.
- [105] P. V. Ranganathan, C. Jayakumar, et G. Ramesh, « Netrin-1-treated macrophages protect the kidney against ischemia-reperfusion injury and suppress inflammation by inducing M2 polarization », *Am J Physiol Renal Physiol*, vol. 304, n° 7, p. F948-F957, avr. 2013, doi: 10.1152/ajprenal.00580.2012.
- [106] R. K. Tadagavadi, W. Wang, et G. Ramesh, « Netrin-1 regulates Th1/Th2/Th17 cytokine production and inflammation through UNC5B receptor and protects kidney against ischemia-reperfusion injury », *J Immunol*, vol. 185, n° 6, p. 3750-3758, sept. 2010, doi: 10.4049/jimmunol.1000435.
- [107] P. Rosenberger *et al.*, « Hypoxia-inducible factor-dependent induction of netrin-1 dampens inflammation caused by hypoxia », *Nat Immunol*, vol. 10, n° 2, p. 195-202, févr. 2009, doi: 10.1038/ni.1683.
- [108] A. Paradisi *et al.*, « NF-κB Regulates Netrin-1 Expression and Affects the Conditional Tumor Suppressive Activity of the Netrin-1 Receptors », *Gastroenterology*, vol. 135, n° 4, p. 1248-1257, oct. 2008, doi: 10.1053/j.gastro.2008.06.080.
- [109] B. Ramkhelawon *et al.*, « Hypoxia induces netrin-1 and Unc5b in atherosclerotic plaques: a mechanism for macrophage retention and survival », *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, vol. 33, n° 6, p. 1180-1188, juin 2013, doi: 10.1161/ATVBAHA.112.301008.
- [110] B. Ramkhelawon *et al.*, « Netrin-1 promotes adipose tissue macrophage retention and insulin resistance in obesity », *Nature medicine*, vol. 20, mars 2014, doi: 10.1038/nm.3467.
- [111] M. Sharma *et al.*, « Netrin-1 Alters Adipose Tissue Macrophage Fate and Function in Obesity », *Immunometabolism*, vol. 1, n° 2, oct. 2019, doi: 10.20900/immunometab20190010.
- [112] A. Mentxaka *et al.*, « Netrin-1 Promotes Visceral Adipose Tissue Inflammation in Obesity and Is Associated with Insulin Resistance », *Nutrients*, vol. 14, n° 20, p. 4372, oct. 2022, doi: 10.3390/nu14204372.
- [113] S. Zhu *et al.*, « Subchondral bone osteoclasts induce sensory innervation and osteoarthritis pain », *Journal of Clinical Investigation*, vol. 129, n° 3, p. 1076-1093, févr. 2019, doi: 10.1172/JCI121561.

- [114] R. Rudjito *et al.*, « Bone innervation and vascularization regulated by osteoclasts contribute to refractive pain-related behavior in the collagen antibody-induced arthritis model ». *bioRxiv*, p. 2021.04.19.440384, 20 avril 2021. doi: 10.1101/2021.04.19.440384.
- [115] M. Diaz-delCastillo *et al.*, « Metastatic infiltration of nervous tissue and periosteal nerve sprouting in multiple myeloma induced bone pain ». *bioRxiv*, p. 2022.12.29.522199, 6 mars 2023. doi: 10.1101/2022.12.29.522199.
- [116] L. K. Symons *et al.*, « The Immunopathophysiology of Endometriosis », *Trends in Molecular Medicine*, vol. 24, n° 9, p. 748-762, sept. 2018, doi: 10.1016/j.molmed.2018.07.004.
- [117] H. Kajiyama *et al.*, « Endometriosis and cancer », *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 133, p. 186-192, mars 2019, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.12.015.
- [118] R. Singh, A. Letai, et K. Sarosiek, « Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins », *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 20, n° 3, p. 175-193, mars 2019, doi: 10.1038/s41580-018-0089-8.
- [119] F. C. Lourenço *et al.*, « Netrin-1 interacts with amyloid precursor protein and regulates amyloid-beta production », *Cell Death Differ*, vol. 16, n° 5, p. 655-663, mai 2009, doi: 10.1038/cdd.2008.191.
- [120] L. Sun *et al.*, « Decreased Netrin-1 and Correlated Th17/Tregs Balance Disorder in A β 1-42 Induced Alzheimer's Disease Model Rats », *Front Aging Neurosci*, vol. 11, p. 124, mai 2019, doi: 10.3389/fnagi.2019.00124.
- [121] M. Jasmin *et al.*, « Netrin-1 and its receptor DCC modulate survival and death of dopamine neurons and Parkinson's disease features », *EMBO J*, vol. 40, n° 3, févr. 2021, doi: 10.15252/embj.2020105537.
- [122] K. L. Ring *et al.*, « Genomic Analysis Reveals Disruption of Striatal Neuronal Development and Therapeutic Targets in Human Huntington's Disease Neural Stem Cells », *Stem Cell Reports*, vol. 5, n° 6, p. 1023-1038, déc. 2015, doi: 10.1016/j.stemcr.2015.11.005.
- [123] J. Fitamant *et al.*, « Netrin-1 expression confers a selective advantage for tumor cell survival in metastatic breast cancer », *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 105, n° 12, p. 4850-4855, mars 2008, doi: 10.1073/pnas.0709810105.
- [124] C. Rossoni, A. Bardet, B. Geoerger, et X. Paoletti, « Sequential or combined designs for Phase I/II clinical trials? A simulation study », *Clinical Trials*, vol. 16, n° 6, p. 635-644, déc. 2019, doi: 10.1177/1740774519872702.
- [125] E. A. Gehan, « The determination of the number of patients required in a preliminary and a follow-up trial of a new chemotherapeutic agent », *Journal of Chronic Diseases*, vol. 13, n° 4, p. 346-353, avr. 1961, doi: 10.1016/0021-9681(61)90060-1.
- [126] D. Kryza *et al.*, « From netrin-1-targeted SPECT/CT to internal radiotherapy for management of advanced solid tumors », *EMBO Molecular Medicine*, vol. n/a, n° n/a, p. e16732, mars 2023, doi: 10.15252/emmm.202216732.
- [127] S. Ramón y Cajal *et al.*, « Clinical implications of intratumor heterogeneity: challenges and opportunities », *J Mol Med (Berl)*, vol. 98, n° 2, p. 161-177, 2020, doi: 10.1007/s00109-020-01874-2.
- [128] J. Furth, M. C. Kahn, et C. Breedis, « The Transmission of Leukemia of Mice with a Single Cell », *The American Journal of Cancer*, vol. 31, n° 2, p. 276-282, oct. 1937, doi: 10.1158/ajc.1937.276.
- [129] D. Bonnet et J. E. Dick, « Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell », *Nat Med*, vol. 3, n° 7, Art. n° 7, juill. 1997, doi: 10.1038/nm0797-730.
- [130] M. Al-Hajj, M. S. Wicha, A. Benito-Hernandez, S. J. Morrison, et M. F. Clarke,

- « Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells », *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 100, n° 7, p. 3983-3988, avr. 2003, doi: 10.1073/pnas.0530291100.
- [131] F. Notta *et al.*, « Evolution of human BCR–ABL1 lymphoblastic leukaemia-initiating cells », *Nature*, vol. 469, n° 7330, Art. n° 7330, janv. 2011, doi: 10.1038/nature09733.
- [132] K. Anderson *et al.*, « Genetic variegation of clonal architecture and propagating cells in leukaemia », *Nature*, vol. 469, n° 7330, Art. n° 7330, janv. 2011, doi: 10.1038/nature09650.
- [133] B. Dave, V. Mittal, N. M. Tan, et J. C. Chang, « Epithelial-mesenchymal transition, cancer stem cells and treatment resistance », *Breast Cancer Research*, vol. 14, n° 1, p. 202, janv. 2012, doi: 10.1186/bcr2938.
- [134] V. Plaks, N. Kong, et Z. Werb, « The Cancer Stem Cell Niche: How Essential is the Niche in Regulating Stemness of Tumor Cells? », *Cell Stem Cell*, vol. 16, n° 3, p. 225-238, mars 2015, doi: 10.1016/j.stem.2015.02.015.
- [135] P.-J. Sung *et al.*, « Cancer-Associated Fibroblasts Produce Netrin-1 to Control Cancer Cell Plasticity », *Cancer Research*, vol. 79, n° 14, p. 3651-3661, juill. 2019, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-18-2952.
- [136] T. Celià-Terrassa et Y. Kang, « Metastatic niche functions and therapeutic opportunities », *Nat Cell Biol*, vol. 20, n° 8, Art. n° 8, août 2018, doi: 10.1038/s41556-018-0145-9.
- [137] O. H. Ocaña *et al.*, « Metastatic Colonization Requires the Repression of the Epithelial-Mesenchymal Transition Inducer Prrx1 », *Cancer Cell*, vol. 22, n° 6, p. 709-724, déc. 2012, doi: 10.1016/j.ccr.2012.10.012.
- [138] J. H. Tsai, J. L. Donaher, D. A. Murphy, S. Chau, et J. Yang, « Spatiotemporal Regulation of Epithelial-Mesenchymal Transition Is Essential for Squamous Cell Carcinoma Metastasis », *Cancer Cell*, vol. 22, n° 6, p. 725-736, déc. 2012, doi: 10.1016/j.ccr.2012.09.022.
- [139] D. A. Lawson *et al.*, « Single-cell analysis reveals a stem-cell program in human metastatic breast cancer cells », *Nature*, vol. 526, n° 7571, Art. n° 7571, oct. 2015, doi: 10.1038/nature15260.
- [140] W. Jeong et E. Jho, « Regulation of the Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein LRP6 and Its Association With Disease: Wnt/ β -Catenin Signaling and Beyond », *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, vol. 9, 2021, Consulté le: 6 juin 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2021.714330>
- [141] M. Katoh, « Canonical and non-canonical WNT signaling in cancer stem cells and their niches: Cellular heterogeneity, omics reprogramming, targeted therapy and tumor plasticity (Review) », *Int J Oncol*, vol. 51, n° 5, p. 1357-1369, sept. 2017, doi: 10.3892/ijo.2017.4129.
- [142] S. Sonderegger, J. Pollheimer, et M. Knöfler, « Wnt Signalling in Implantation, Decidualisation and Placental Differentiation - Review », *Placenta*, vol. 31, p. 839-47, oct. 2010, doi: 10.1016/j.placenta.2010.07.011.
- [143] G.-B. Jang *et al.*, « Blockade of Wnt/ β -catenin signaling suppresses breast cancer metastasis by inhibiting CSC-like phenotype », *Sci Rep*, vol. 5, p. 12465, juill. 2015, doi: 10.1038/srep12465.
- [144] G. Wu *et al.*, « MiR-1207 overexpression promotes cancer stem cell-like traits in ovarian cancer by activating the Wnt/ β -catenin signaling pathway », *Oncotarget*, vol. 6, n° 30, p. 28882-28894, août 2015.
- [145] S. A. Ibrahim *et al.*, « Syndecan-1 is a novel molecular marker for triple negative inflammatory breast cancer and modulates the cancer stem cell phenotype via the IL-6/STAT3, Notch and EGFR signaling pathways », *Mol Cancer*, vol. 16, n° 1, p. 57, mars 2017, doi: 10.1186/s12943-017-0621-z.

- [146] Y. Zhang et X. Wang, « Targeting the Wnt/ β -catenin signaling pathway in cancer », *Journal of Hematology & Oncology*, vol. 13, n° 1, p. 165, déc. 2020, doi: 10.1186/s13045-020-00990-3.
- [147] M. Bartucci *et al.*, « TAZ is required for metastatic activity and chemoresistance of breast cancer stem cells », *Oncogene*, vol. 34, n° 6, Art. n° 6, févr. 2015, doi: 10.1038/onc.2014.5.
- [148] P. Vici *et al.*, « The Hippo transducer TAZ as a biomarker of pathological complete response in HER2-positive breast cancer patients treated with trastuzumab-based neoadjuvant therapy », *Oncotarget*, vol. 5, n° 20, p. 9619-9625, sept. 2014, doi: 10.18632/oncotarget.2449.
- [149] S. Lehn *et al.*, « Decreased expression of Yes-associated protein is associated with outcome in the luminal A breast cancer subgroup and with an impaired tamoxifen response », *BMC Cancer*, vol. 14, n° 1, p. 119, févr. 2014, doi: 10.1186/1471-2407-14-119.
- [150] J. Díaz-Martín *et al.*, « Nuclear TAZ expression associates with the triple-negative phenotype in breast cancer », *Endocr Relat Cancer*, vol. 22, n° 3, p. 443-454, juin 2015, doi: 10.1530/ERC-14-0456.
- [151] C. A. Hall *et al.*, « Hippo Pathway Effector Yap is an Ovarian Cancer Oncogene », *Cancer Res*, vol. 70, n° 21, p. 8517-8525, nov. 2010, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-1242.
- [152] Y. Xia *et al.*, « YAP Promotes Ovarian Cancer Cell Tumorigenesis and Is Indicative of a Poor Prognosis for Ovarian Cancer Patients », *PLoS One*, vol. 9, n° 3, p. e91770, mars 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0091770.
- [153] S. J. Morrison et J. Kimble, « Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer », *Nature*, vol. 441, n° 7097, Art. n° 7097, juin 2006, doi: 10.1038/nature04956.
- [154] A. R. Safa, « Resistance to Cell Death and Its Modulation in Cancer Stem Cells », *Crit Rev Oncog*, vol. 21, n° 3-4, p. 203-219, 2016, doi: 10.1615/CritRevOncog.2016016976.
- [155] A. Yasmeen, M.-C. Beauchamp, E. Piura, E. Segal, M. Pollak, et W. H. Gotlieb, « Induction of apoptosis by metformin in epithelial ovarian cancer: Involvement of the Bcl-2 family proteins », *Gynecologic Oncology*, vol. 121, n° 3, p. 492-498, juin 2011, doi: 10.1016/j.ygyno.2011.02.021.
- [156] J. R. Brown *et al.*, « Phase II clinical trial of metformin as a cancer stem cell-targeting agent in ovarian cancer », *JCI Insight*, vol. 5, n° 11, p. e133247, doi: 10.1172/jci.insight.133247.
- [157] M. Parton, A. Bardia, S. Kummel, L. Estevez, et C.-S. Huang, « A phase II, open-label, neoadjuvant, randomized study of LCL161 with paclitaxel in patients with triple-negative breast cancer (TNBC). », *Journal of Clinical Oncology*, vol. 33, p. 1014, mai 2015.
- [158] B. Parajuli *et al.*, « Salinomycin induces apoptosis via death receptor-5 up-regulation in cisplatin-resistant ovarian cancer cells », *Anticancer Res*, vol. 33, n° 4, p. 1457-1462, avr. 2013.
- [159] C. Naujokat et R. Steinhart, « Salinomycin as a Drug for Targeting Human Cancer Stem Cells », *BioMed Research International*, vol. 2012, p. e950658, nov. 2012, doi: 10.1155/2012/950658.
- [160] Y. Miao *et al.*, « Adaptive Immune Resistance Emerges from Tumor-Initiating Stem Cells », *Cell*, vol. 177, n° 5, p. 1172-1186.e14, mai 2019, doi: 10.1016/j.cell.2019.03.025.
- [161] M. Sultan *et al.*, « Epigenetic Silencing of TAP1 in Aldefluor+ Breast Cancer Stem Cells Contributes to Their Enhanced Immune Evasion », *Stem Cells*, vol. 36, n° 5, p. 641-654, mai 2018, doi: 10.1002/stem.2780.
- [162] I. Dutta *et al.*, « ADAM protease inhibition overcomes resistance of breast cancer stem-like cells to $\gamma\delta$ T cell immunotherapy », *Cancer Lett*, vol. 496, p. 156-168, janv. 2021, doi:

10.1016/j.canlet.2020.10.013.

[163] S. Raghavan, P. Mehta, Y. Xie, Y. L. Lei, et G. Mehta, « Ovarian cancer stem cells and macrophages reciprocally interact through the WNT pathway to promote pro-tumoral and malignant phenotypes in 3D engineered microenvironments », *J Immunother Cancer*, vol. 7, n° 1, p. 190, juill. 2019, doi: 10.1186/s40425-019-0666-1.

[164] P. Cammareri, Y. Lombardo, M. G. Francipane, S. Bonventre, M. Todaro, et G. Stassi, « Isolation and culture of colon cancer stem cells », *Methods Cell Biol*, vol. 86, p. 311-324, 2008, doi: 10.1016/S0091-679X(08)00014-9.

[165] D. Ponti *et al.*, « Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties », *Cancer Res*, vol. 65, n° 13, p. 5506-5511, juill. 2005, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-0626.

[166] C. Ginestier *et al.*, « ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome », *Cell Stem Cell*, vol. 1, n° 5, p. 555-567, nov. 2007, doi: 10.1016/j.stem.2007.08.014.

[167] E. Charafe-Jauffret *et al.*, « Breast cancer cell lines contain functional cancer stem cells with metastatic capacity and a distinct molecular signature », *Cancer Res*, vol. 69, n° 4, p. 1302-1313, févr. 2009, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-2741.

[168] E. Pastrana, V. Silva-Vargas, et F. Doetsch, « Eyes Wide Open: A Critical Review of Sphere-Formation as an Assay For Stem Cells », *Cell Stem Cell*, vol. 8, n° 5, p. 486-498, mai 2011, doi: 10.1016/j.stem.2011.04.007.

[169] X. Zhang, K. Powell, et L. Li, « Breast Cancer Stem Cells: Biomarkers, Identification and Isolation Methods, Regulating Mechanisms, Cellular Origin, and Beyond », *Cancers*, vol. 12, n° 12, déc. 2020, doi: 10.3390/cancers12123765.

[170] F. F. de Beça *et al.*, « Cancer stem cells markers CD44, CD24 and ALDH1 in breast cancer special histological types », *J Clin Pathol*, vol. 66, n° 3, p. 187-191, mars 2013, doi: 10.1136/jclinpath-2012-201169.

[171] M. P. Moreira, L. da Conceição Braga, G. D. Cassali, et L. M. Silva, « STAT3 as a promising chemoresistance biomarker associated with the CD44+/high/CD24-/low/ALDH+ BCSCs-like subset of the triple-negative breast cancer (TNBC) cell line », *Experimental Cell Research*, vol. 363, n° 2, p. 283-290, févr. 2018, doi: 10.1016/j.yexcr.2018.01.018.

[172] C. Sheridan *et al.*, « CD44+/CD24- breast cancer cells exhibit enhanced invasive properties: an early step necessary for metastasis », *Breast Cancer Res*, vol. 8, n° 5, p. R59, 2006, doi: 10.1186/bcr1610.

[173] M. Abdoli Shadbad *et al.*, « A Systematic Review to Clarify the Prognostic Values of CD44 and CD44+CD24- Phenotype in Triple-Negative Breast Cancer Patients: Lessons Learned and The Road Ahead », *Front Oncol*, vol. 11, p. 689839, août 2021, doi: 10.3389/fonc.2021.689839.

[174] A. N. Seo *et al.*, « Expression of breast cancer stem cell markers as predictors of prognosis and response to trastuzumab in HER2-positive breast cancer », *Br J Cancer*, vol. 114, n° 10, p. 1109-1116, mai 2016, doi: 10.1038/bjc.2016.101.

[175] I. Rabinovich *et al.*, « Cancer stem cell markers ALDH1 and CD44+/CD24- phenotype and their prognosis impact in invasive ductal carcinoma », *Eur J Histochem*, vol. 62, n° 3, p. 2943, sept. 2018, doi: 10.4081/ejh.2018.2943.

[176] B. K. Abraham, P. Fritz, M. McClellan, P. Hauptvogel, M. Athelou, et H. Brauch, « Prevalence of CD44+/CD24-/low Cells in Breast Cancer May Not Be Associated with Clinical Outcome but May Favor Distant Metastasis », *Clinical Cancer Research*, vol. 11, n° 3, p. 1154-1159, févr. 2005, doi: 10.1158/1078-0432.1154.11.3.

- [177] P.-K. Lo *et al.*, « CD49f and CD61 identify Her2/neu-induced mammary tumor-initiating cells that are potentially derived from luminal progenitors and maintained by the integrin–TGFβ signaling », *Oncogene*, vol. 31, n° 21, Art. n° 21, mai 2012, doi: 10.1038/onc.2011.439.
- [178] J. Gomez-Miragaya et E. González-Suárez, « Tumor-initiating CD49f cells are a hallmark of chemoresistant triple negative breast cancer », *Mol Cell Oncol*, vol. 4, n° 4, p. e1338208, juin 2017, doi: 10.1080/23723556.2017.1338208.
- [179] A. Vassilopoulos, C. Chisholm, T. Lahusen, H. Zheng, et C.-X. Deng, « A critical role of CD29 and CD49f in mediating metastasis for cancer-initiating cells isolated from a Brca1-associated mouse model of breast cancer », *Oncogene*, vol. 33, n° 47, Art. n° 47, nov. 2014, doi: 10.1038/onc.2013.516.
- [180] D. L. P. Brooks *et al.*, « ITGA6 is directly regulated by hypoxia-inducible factors and enriches for cancer stem cell activity and invasion in metastatic breast cancer models », *Mol Cancer*, vol. 15, p. 26, mars 2016, doi: 10.1186/s12943-016-0510-x.
- [181] F. Ye *et al.*, « The Presence of EpCAM(-)/CD49f(+) Cells in Breast Cancer Is Associated with a Poor Clinical Outcome », *J Breast Cancer*, vol. 18, n° 3, p. 242-248, sept. 2015, doi: 10.4048/jbc.2015.18.3.242.
- [182] T. Hu, R. Zhou, Y. Zhao, et G. Wu, « Integrin α6/Akt/Erk signaling is essential for human breast cancer resistance to radiotherapy », *Sci Rep*, vol. 6, p. 33376, sept. 2016, doi: 10.1038/srep33376.
- [183] M. H. Wright, A. M. Calcagno, C. D. Salcido, M. D. Carlson, S. V. Ambudkar, et L. Varticovski, « Brca1 breast tumors contain distinct CD44+/CD24- and CD133+ cells with cancer stem cell characteristics », *Breast Cancer Res*, vol. 10, n° 1, p. R10, 2008, doi: 10.1186/bcr1855.
- [184] A. K. Croker *et al.*, « High aldehyde dehydrogenase and expression of cancer stem cell markers selects for breast cancer cells with enhanced malignant and metastatic ability », *J Cell Mol Med*, vol. 13, n° 8b, p. 2236-2252, août 2009, doi: 10.1111/j.1582-4934.2008.00455.x.
- [185] R. Nadal *et al.*, « CD133 expression in circulating tumor cells from breast cancer patients: potential role in resistance to chemotherapy », *Int J Cancer*, vol. 133, n° 10, p. 2398-2407, nov. 2013, doi: 10.1002/ijc.28263.
- [186] N. Aomatsu *et al.*, « CD133 Is a Useful Surrogate Marker for Predicting Chemosensitivity to Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer », *PLoS One*, vol. 7, n° 9, p. e45865, sept. 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0045865.
- [187] F. Brugnoli *et al.*, « In triple negative breast tumor cells, PLC-β2 promotes the conversion of CD133^{high} to CD133^{low} phenotype and reduces the CD133-related invasiveness », *Mol Cancer*, vol. 12, p. 165, déc. 2013, doi: 10.1186/1476-4598-12-165.
- [188] P. Xia, « CD133 mRNA may be a suitable prognostic marker for human breast cancer », *Stem Cell Investig*, vol. 4, p. 87, nov. 2017, doi: 10.21037/sci.2017.10.03.
- [189] C. Joseph *et al.*, « Overexpression of the cancer stem cell marker CD133 confers a poor prognosis in invasive breast cancer », *Breast Cancer Res Treat*, vol. 174, n° 2, p. 387-399, avr. 2019, doi: 10.1007/s10549-018-05085-9.
- [190] S. Zhang *et al.*, « Identification and Characterization of Ovarian Cancer-Initiating Cells from Primary Human Tumors », *Cancer Res*, vol. 68, n° 11, p. 4311-4320, juin 2008, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-0364.
- [191] A. B. Alvero *et al.*, « Molecular phenotyping of human ovarian cancer stem cells unravel the mechanisms for repair and chemo-resistance », *Cell Cycle*, vol. 8, n° 1, p. 158-166, janv. 2009.
- [192] M. F. Shi *et al.*, « Identification of cancer stem cell-like cells from human epithelial ovarian carcinoma cell line », *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 67, n° 22, p. 3915-3925, nov. 2010, doi:

10.1007/s00018-010-0420-9.

[193] Q. He *et al.*, « Isolation and Characterization of Cancer Stem Cells from High-Grade Serous Ovarian Carcinomas », *Cellular Physiology and Biochemistry*, vol. 33, n° 1, p. 173-184, janv. 2014, doi: 10.1159/000356660.

[194] E. Meng *et al.*, « CD44+/CD24- ovarian cancer cells demonstrate cancer stem cell properties and correlate to survival », *Clin Exp Metastasis*, vol. 29, n° 8, p. 939-948, déc. 2012, doi: 10.1007/s10585-012-9482-4.

[195] J. Zhou *et al.*, « CD44 Expression Predicts Prognosis of Ovarian Cancer Patients Through Promoting Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) by Regulating Snail, ZEB1, and Caveolin-1 », *Front Oncol*, vol. 9, p. 802, août 2019, doi: 10.3389/fonc.2019.00802.

[196] H. J. Kim *et al.*, « Different prognostic significance of CD24 and CD44 expression in breast cancer according to hormone receptor status », *The Breast*, vol. 20, n° 1, p. 78-85, févr. 2011, doi: 10.1016/j.breast.2010.08.001.

[197] Z. Wang, Q. Wang, Q. Wang, Y. Wang, et J. Chen, « Prognostic significance of CD24 and CD44 in breast cancer: a meta-analysis », *Int J Biol Markers*, vol. 32, n° 1, p. e75-e82, mars 2017, doi: 10.5301/jbm.5000224.

[198] J. Lin et D. Ding, « The prognostic role of the cancer stem cell marker CD44 in ovarian cancer: a meta-analysis », *Cancer Cell Int*, vol. 17, p. 8, 2017, doi: 10.1186/s12935-016-0376-4.

[199] D. Burgos-Ojeda *et al.*, « CD24+ Ovarian Cancer Cells Are Enriched for Cancer-Initiating Cells and Dependent on JAK2 Signaling for Growth and Metastasis », *Mol Cancer Ther*, vol. 14, n° 7, p. 1717-1727, juill. 2015, doi: 10.1158/1535-7163.MCT-14-0607.

[200] M.-Q. Gao, Y.-P. Choi, S. Kang, J. H. Youn, et N.-H. Cho, « CD24+ cells from hierarchically organized ovarian cancer are enriched in cancer stem cells », *Oncogene*, vol. 29, n° 18, Art. n° 18, mai 2010, doi: 10.1038/onc.2010.35.

[201] K. Meirelles *et al.*, « Human ovarian cancer stem/progenitor cells are stimulated by doxorubicin but inhibited by Mullerian inhibiting substance », *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 109, n° 7, p. 2358-2363, févr. 2012, doi: 10.1073/pnas.1120733109.

[202] G. Kristiansen, C. Denkert, K. Schlüns, E. Dahl, C. Pilarsky, et S. Hauptmann, « CD24 Is Expressed in Ovarian Cancer and Is a New Independent Prognostic Marker of Patient Survival », *The American Journal of Pathology*, vol. 161, n° 4, p. 1215-1221, oct. 2002, doi: 10.1016/S0002-9440(10)64398-2.

[203] L. Luo *et al.*, « Ovarian cancer cells with the CD117 phenotype are highly tumorigenic and are related to chemotherapy outcome », *Exp Mol Pathol*, vol. 91, n° 2, p. 596-602, oct. 2011, doi: 10.1016/j.yexmp.2011.06.005.

[204] W. K. Chau, C. K. Ip, A. S. C. Mak, H.-C. Lai, et A. S. T. Wong, « c-Kit mediates chemoresistance and tumor-initiating capacity of ovarian cancer cells through activation of Wnt/ β -catenin-ATP-binding cassette G2 signaling », *Oncogene*, vol. 32, n° 22, p. 2767-2781, mai 2013, doi: 10.1038/onc.2012.290.

[205] M. R. Raspollini, G. Amunni, A. Villanucci, G. Baroni, A. Taddei, et G. L. Taddei, « c-KIT expression and correlation with chemotherapy resistance in ovarian carcinoma: an immunocytochemical study », *Ann Oncol*, vol. 15, n° 4, p. 594-597, avr. 2004, doi: 10.1093/annonc/mdh139.

[206] B. Yang, X. Yan, L. Liu, C. Jiang, et S. Hou, « Overexpression of the cancer stem cell marker CD117 predicts poor prognosis in epithelial ovarian cancer patients: evidence from meta-analysis », *Onco Targets Ther*, vol. 10, p. 2951-2961, juin 2017, doi: 10.2147/OTT.S136549.

- [207] M. D. Curley *et al.*, « CD133 expression defines a tumor initiating cell population in primary human ovarian cancer », *Stem Cells*, vol. 27, n° 12, p. 2875-2883, déc. 2009, doi: 10.1002/stem.236.
- [208] C. L. Liu, Y. J. Chen, M. H. Fan, Y. J. Liao, et T. L. Mao, « Characteristics of CD133-Sustained Chemoresistant Cancer Stem-Like Cells in Human Ovarian Carcinoma », *Int J Mol Sci*, vol. 21, n° 18, p. 6467, sept. 2020, doi: 10.3390/ijms21186467.
- [209] J. Zhang, X. Guo, D. Y. Chang, D. G. Rosen, I. Mercado-Uribe, et J. Liu, « CD133 expression associated with poor prognosis in ovarian cancer », *Mod Pathol*, vol. 25, n° 3, p. 456-464, mars 2012, doi: 10.1038/modpathol.2011.170.
- [210] A. Golebiewska, N. H. C. Brons, R. Bjerkvig, et S. P. Niclou, « Critical Appraisal of the Side Population Assay in Stem Cell and Cancer Stem Cell Research », *Cell Stem Cell*, vol. 8, n° 2, p. 136-147, févr. 2011, doi: 10.1016/j.stem.2011.01.007.
- [211] C. N. Landen *et al.*, « Targeting Aldehyde Dehydrogenase Cancer Stem Cells in Ovarian Cancer », *Mol Cancer Ther*, vol. 9, n° 12, p. 3186-3199, déc. 2010, doi: 10.1158/1535-7163.MCT-10-0563.
- [212] S. F. Jones et R. C. Whitman, « Primary sarcoma of the lower end of the femur involving the synovial membrane », *Ann Surg*, vol. 60, n° 4, p. 440-450, oct. 1914.
- [213] K. J. Anderson et O. Wildermuth, « 50 Years Ago in CORR®: Synovial Sarcoma », *Clinical Orthopaedics and Related Research*, vol. 471, n° 3, p. 1064-1066, mars 2013.
- [214] M. F. Okcu *et al.*, « Synovial sarcoma of childhood and adolescence: a multicenter, multivariate analysis of outcome », *J Clin Oncol*, vol. 21, n° 8, p. 1602-1611, avr. 2003, doi: 10.1200/JCO.2003.07.008.
- [215] S. L. Wolden et K. M. Alektiar, « Sarcomas Across the Age Spectrum », *Seminars in Radiation Oncology*, vol. 20, n° 1, p. 45-51, janv. 2010, doi: 10.1016/j.semradonc.2009.09.003.
- [216] M. N. Aytakin, R. Öztürk, K. Amer, et A. Yapar, « Epidemiology, incidence, and survival of synovial sarcoma subtypes: SEER database analysis », *J Orthop Surg (Hong Kong)*, vol. 28, n° 2, p. 2309499020936009, mai 2020, doi: 10.1177/2309499020936009.
- [217] M. A. Smolle, M. Parry, L. Jeys, S. Abudu, et R. Grimer, « Synovial sarcoma: Do children do better? », *European Journal of Surgical Oncology*, vol. 45, n° 2, p. 254-260, févr. 2019, doi: 10.1016/j.ejso.2018.07.006.
- [218] I. Sultan, C. Rodriguez-Galindo, R. Saab, S. Yasir, M. Casanova, et A. Ferrari, « Comparing children and adults with synovial sarcoma in the Surveillance, Epidemiology, and End Results program, 1983 to 2005 », *Cancer*, vol. 115, n° 15, p. 3537-3547, 2009, doi: 10.1002/cncr.24424.
- [219] H. Moch, Éd., « Soft Tissue and Bone Tumours WHO Classification of Tumours / Volume 3 », *WHO Classification of Tumours*, vol. Volume 3, 2020, Consulté le: 10 avril 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.zora.uzh.ch/id/eprint/196012/>
- [220] « Burden and centralised treatment in Europe of rare tumours: results of RARECAREnet—a population-based study », *The Lancet Oncology*, vol. 18, n° 8, p. 1022-1039, août 2017, doi: 10.1016/S1470-2045(17)30445-X.
- [221] C. Fischer, « Synovial Sarcoma », *Annals of Diagnostic Pathology*, vol. 2, n° 5, p. 401-421, déc. 1998.
- [222] M. van de Rijn, F. Barr, Q.-B. Xiong, M. Hedges, J. Shipley, et C. Fisher, « Poorly Differentiated Synovial Sarcoma: An Analysis of Clinical, Pathologic, and Molecular Genetic Features. », *The American Journal of Surgical Pathology*, vol. 23, n° 1, p. 106-112, janv. 1999.
- [223] L. Xiong, Z. Chen, Y. Zhou, H. Li, et T. Xiao, « The survival and prognosis analysis of synovial sarcoma subtypes: a Surveillance, Epidemiology, and End Results population-based

analysis », *International Orthopaedics (SICOT)*, vol. 44, n° 12, p. 2779-2786, déc. 2020, doi: 10.1007/s00264-020-04708-5.

[224] T. Saito, « The SYT-SSX fusion protein and histological epithelial differentiation in synovial sarcoma: relationship with extracellular matrix remodeling », *Int J Clin Exp Pathol*, vol. 6, n° 11, p. 2272-2279, oct. 2013.

[225] S. Takenaka *et al.*, « Prognostic implication of SYT-SSX fusion type in synovial sarcoma: a multi-institutional retrospective analysis in Japan », *Oncol Rep*, vol. 19, n° 2, p. 467-476, févr. 2008.

[226] S. Stegmaier *et al.*, « The prognostic impact of SYT-SSX fusion type and histological grade in pediatric patients with synovial sarcoma treated according to the CWS (Cooperative Weichteilsarkom Studie) trials », *Pediatr Blood Cancer*, vol. 64, n° 1, p. 89-95, janv. 2017, doi: 10.1002/pbc.26206.

[227] L. Guillou *et al.*, « Histologic grade, but not SYT-SSX fusion type, is an important prognostic factor in patients with synovial sarcoma: a multicenter, retrospective analysis », *J Clin Oncol*, vol. 22, n° 20, p. 4040-4050, oct. 2004, doi: 10.1200/JCO.2004.11.093.

[228] T. Ren *et al.*, « The clinical implication of SS18-SSX fusion gene in synovial sarcoma », *Br J Cancer*, vol. 109, n° 8, p. 2279-2285, oct. 2013, doi: 10.1038/bjc.2013.547.

[229] H. Inagaki, T. Nagasaka, T. Otsuka, E. Sugiura, N. Nakashima, et T. Eimoto, « Association of SYT-SSX fusion types with proliferative activity and prognosis in synovial sarcoma », *Mod Pathol*, vol. 13, n° 5, p. 482-488, mai 2000, doi: 10.1038/modpathol.3880083.

[230] M. Ladanyi *et al.*, « Impact of SYT-SSX fusion type on the clinical behavior of synovial sarcoma: a multi-institutional retrospective study of 243 patients », *Cancer Res*, vol. 62, n° 1, p. 135-140, janv. 2002.

[231] R. Deshmukh, H. Mankin, et S. Singer, « Synovial Sarcoma: The Importance of Size and Location for Su... »; *Clinical Orthopaedics and Related Research*, n° 419, Consulté le: 11 avril 2023. [En ligne]. Disponible sur: https://journals.lww.com/clinorthop/fulltext/2004/02000/synovial_sarcoma__the_importance_of_size_and.25.aspx

[232] B. M. Speth *et al.*, « Synovial sarcoma in patients under 20 years of age: a multicenter study with a minimum follow-up of 10 years », *J Child Orthop*, vol. 5, n° 5, p. 335-342, oct. 2011, doi: 10.1007/s11832-011-0360-4.

[233] M. V. C. De Silva, A. Barrett, et R. Reid, « Premonitory Pain Preceding Swelling: A Distinctive Clinical Presentation of Synovial Sarcoma which may Prompt Early Detection », *Sarcoma*, vol. 7, n° 3-4, p. 131-135, 2003, doi: 10.1080/13577140310001644788.

[234] A. M. Gazendam, S. Popovic, S. Munir, N. Parasu, D. Wilson, et M. Ghert, « Synovial Sarcoma: A Clinical Review », *Current Oncology*, vol. 28, n° 3, p. 1909-1920, mai 2021, doi: 10.3390/curroncol28030177.

[235] S. D. Bixby, S. Hettmer, G. A. Taylor, et S. D. Voss, « Synovial Sarcoma in Children: Imaging Features and Common Benign Mimics », *American Journal of Roentgenology*, vol. 195, n° 4, p. 1026-1032, oct. 2010, doi: 10.2214/AJR.10.4348.

[236] U. Tateishi, T. Hasegawa, Y. Beppu, M. Satake, et N. Moriyama, « Synovial Sarcoma of the Soft Tissues: Prognostic Significance of Imaging Features », *Journal of Computer Assisted Tomography*, vol. 28, n° 1, p. 140, févr. 2004.

[237] S. E. Ten Heuvel, H. J. Hoekstra, et A. J. H. Suurmeijer, « Diagnostic Accuracy of FISH and RT-PCR in 50 Routinely Processed Synovial Sarcomas », *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*, vol. 16, n° 3, p. 246, mai 2008, doi: 10.1097/PAI.0b013e31815349f5.

[238] D. J. Biau *et al.*, « Local recurrence of localized soft tissue sarcoma », *Cancer*, vol. 118,

n° 23, p. 5867-5877, 2012, doi: 10.1002/cncr.27639.

[239] A. Bilgeri *et al.*, « The Effect of Resection Margin on Local Recurrence and Survival in High Grade Soft Tissue Sarcoma of the Extremities: How Far Is Far Enough? », *Cancers (Basel)*, vol. 12, n° 9, p. 2560, sept. 2020, doi: 10.3390/cancers12092560.

[240] K. W. Naing *et al.*, « Perioperative Radiotherapy is Associated with Improved Survival among Patients with Synovial Sarcoma: A SEER Analysis », *J Surg Oncol*, vol. 111, n° 2, p. 158-164, févr. 2015, doi: 10.1002/jso.23780.

[241] S. Song *et al.*, « Effects of Adjuvant Radiotherapy in Patients With Synovial Sarcoma », *American Journal of Clinical Oncology*, vol. 40, n° 3, p. 306, juin 2017, doi: 10.1097/COC.000000000000148.

[242] A. A. Gingrich *et al.*, « Radiotherapy is Associated With Improved Survival in Patients With Synovial Sarcoma Undergoing Surgery: A National Cancer Database Analysis », *Journal of Surgical Research*, vol. 255, p. 378-387, nov. 2020, doi: 10.1016/j.jss.2020.05.075.

[243] M. von Mehren *et al.*, « Soft Tissue Sarcoma, Version 2.2016, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology », *ournal of the National Comprehensive Cancer Network*, vol. 14, p. 758-786, 2016.

[244] J. Wang, S. Yongwen, L. Xinfan, J. Jing, et W. Weihu, « Comparison of outcome and toxicity of postoperative intensity-modulated radiation therapy with two-dimensional radiotherapy in patients with soft tissue sarcoma of extremities and trunk », vol. 8, p. 861-1335, mars 2019.

[245] T. F. DeLaney *et al.*, « Radiation Therapy for Control of Soft-Tissue Sarcomas Resected With Positive Margins », *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics*Physics*, vol. 67, n° 5, p. 1460-1469, avr. 2007, doi: 10.1016/j.ijrobp.2006.11.035.

[246] A. Al Yami *et al.*, « Positive surgical margins in soft tissue sarcoma treated with preoperative radiation: is a postoperative boost necessary? », *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, vol. 77, n° 4, p. 1191-1197, juill. 2010, doi: 10.1016/j.ijrobp.2009.06.074.

[247] A. Ferrari *et al.*, « Pediatric Non-Rhabdomyosarcoma Soft Tissue Sarcomas: Standard of Care and Treatment Recommendations from the European Paediatric Soft Tissue Sarcoma Study Group (EpSSG) », *Cancer Manag Res*, vol. 14, p. 2885-2902, sept. 2022, doi: 10.2147/CMAR.S368381.

[248] M. Vlenterie *et al.*, « Outcome of chemotherapy in advanced synovial sarcoma patients: Review of 15 clinical trials from the European Organisation for Research and Treatment of Cancer Soft Tissue and Bone Sarcoma Group; setting a new landmark for studies in this entity », *European Journal of Cancer*, vol. 58, p. 62-72, mai 2016, doi: 10.1016/j.ejca.2016.02.002.

[249] F. C. Eilber *et al.*, « Chemotherapy is associated with improved survival in adult patients with primary extremity synovial sarcoma », *Ann Surg*, vol. 246, n° 1, p. 105-113, juill. 2007, doi: 10.1097/01.sla.0000262787.88639.2b.

[250] A. Ferrari *et al.*, « Synovial sarcoma: a retrospective analysis of 271 patients of all ages treated at a single institution », *Cancer*, vol. 101, n° 3, p. 627-634, août 2004, doi: 10.1002/cncr.20386.

[251] A. Italiano *et al.*, « Neo/adjuvant chemotherapy does not improve outcome in resected primary synovial sarcoma: a study of the French Sarcoma Group », *Annals of Oncology*, vol. 20, n° 3, p. 425-430, mars 2009, doi: 10.1093/annonc/mdn678.

[252] E. Palmerini *et al.*, « Synovial sarcoma: retrospective analysis of 250 patients treated at a single institution », *Cancer*, vol. 115, n° 13, p. 2988-2998, juill. 2009, doi: 10.1002/cncr.24370.

- [253] E. L. Spurrell, C. Fisher, J. M. Thomas, et I. R. Judson, « Prognostic factors in advanced synovial sarcoma: an analysis of 104 patients treated at the Royal Marsden Hospital », *Ann Oncol*, vol. 16, n° 3, p. 437-444, mars 2005, doi: 10.1093/annonc/mdi082.
- [254] A. Ferrari *et al.*, « Synovial sarcoma in children and adolescents: the European Pediatric Soft Tissue Sarcoma Study Group prospective trial (EpSSG NRSTS 2005) », *Ann Oncol*, vol. 26, n° 3, p. 567-572, mars 2015, doi: 10.1093/annonc/mdu562.
- [255] A. Ferrari *et al.*, « Surgery alone is sufficient therapy for children and adolescents with low-risk synovial sarcoma: A joint analysis from the European paediatric soft tissue sarcoma Study Group and the Children's Oncology Group », *Eur J Cancer*, vol. 78, p. 1-6, juin 2017, doi: 10.1016/j.ejca.2017.03.003.
- [256] R. J. Canter, L.-X. Qin, R. G. Maki, M. F. Brennan, M. Ladanyi, et S. Singer, « A Synovial Sarcoma Specific Preoperative Nomogram Supports a Survival Benefit to Ifosfamide-Based Chemotherapy and Improves Risk Stratification for Patients », *Clin Cancer Res*, vol. 14, n° 24, p. 8191-8197, déc. 2008, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-0843.
- [257] S. Sleijfer *et al.*, « Prognostic and predictive factors for outcome to first-line ifosfamide-containing chemotherapy for adult patients with advanced soft tissue sarcomas: an exploratory, retrospective analysis on large series from the European Organization for Research and Treatment of Cancer-Soft Tissue and Bone Sarcoma Group (EORTC-STBSG) », *Eur J Cancer*, vol. 46, n° 1, p. 72-83, janv. 2010, doi: 10.1016/j.ejca.2009.09.022.
- [258] J. H. Edmonson, L. M. Ryan, C. I. Falkson, D. G. Hicks, et R. H. Blum, « Phase II Study of Ifosfamide+Doxorubicin in Patients With Advanced Synovial Sarcomas (E1793): A Trial of the Eastern Cooperative Oncology Group », *Sarcoma*, vol. 7, n° 1, p. 9-11, mars 2003, doi: 10.1080/1357714031000114156.
- [259] W. D. Tap *et al.*, « Doxorubicin plus evofosfamide versus doxorubicin alone in locally advanced, unresectable or metastatic soft-tissue sarcoma (TH CR-406/SARC021): an international, multicentre, open-label, randomised phase 3 trial », *Lancet Oncol*, vol. 18, n° 8, p. 1089-1103, août 2017, doi: 10.1016/S1470-2045(17)30381-9.
- [260] J.-Y. Blay *et al.*, « Surgery in reference centers improves survival of sarcoma patients: a nationwide study », *Annals of Oncology*, vol. 30, n° 7, p. 1143-1153, juill. 2019, doi: 10.1093/annonc/mdz124.
- [261] A. H. Krieb *et al.*, « Synovial sarcomas usually metastasize after >5 years: a multicenter retrospective analysis with minimum follow-up of 10 years for survivors », *Ann Oncol*, vol. 22, n° 2, p. 458-467, févr. 2011, doi: 10.1093/annonc/mdq394.
- [262] D. A. J. Wilson *et al.*, « Designing a Rational Follow-Up Schedule for Patients with Extremity Soft Tissue Sarcoma », *Ann Surg Oncol*, vol. 27, n° 6, p. 2033-2041, juin 2020, doi: 10.1245/s10434-020-08240-z.
- [263] W. T. van der Graaf *et al.*, « Pazopanib for metastatic soft-tissue sarcoma (PALETTE): a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial », *The Lancet*, vol. 379, n° 9829, p. 1879-1886, mai 2012, doi: 10.1016/S0140-6736(12)60651-5.
- [264] S. Sleijfer *et al.*, « Pazopanib, a Multikinase Angiogenesis Inhibitor, in Patients With Relapsed or Refractory Advanced Soft Tissue Sarcoma: A Phase II Study From the European Organisation for Research and Treatment of Cancer–Soft Tissue and Bone Sarcoma Group (EORTC Study 62043) », *JCO*, vol. 27, n° 19, p. 3126-3132, juill. 2009, doi: 10.1200/JCO.2008.21.3223.
- [265] O. Mir *et al.*, « Safety and efficacy of regorafenib in patients with advanced soft tissue sarcoma (REGOSARC): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial », *Lancet Oncol*, vol. 17, n° 12, p. 1732-1742, déc. 2016, doi: 10.1016/S1470-2045(16)30507-1.

- [266] B. A. Van Tine *et al.*, « A phase III study (APROMISS) of AL3818 (Catequentinib, Anlotinib) hydrochloride monotherapy in subjects with metastatic or advanced synovial sarcoma. », *Journal of Clinical Oncology*, vol. 39, n° 15_suppl, p. 11505-11505, mai 2021.
- [267] E. D. G. Fleuren *et al.*, « Phosphoproteomic Profiling Reveals ALK and MET as Novel Actionable Targets across Synovial Sarcoma Subtypes », *Cancer Research*, vol. 77, n° 16, p. 4279-4292, août 2017, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-2550.
- [268] M. Vlenterie *et al.*, « Targeting Cyclin-Dependent Kinases in Synovial Sarcoma: Palbociclib as a Potential Treatment for Synovial Sarcoma Patients », *Ann Surg Oncol*, vol. 23, n° 9, p. 2745-2752, sept. 2016, doi: 10.1245/s10434-016-5341-x.
- [269] Y.-X. Li, S.-S. Ding, W.-J. Wen, L. Han, H.-Q. Wang, et H.-Y. Shi, « Impact of the Activation Status of the Akt/mTOR Signalling Pathway on the Clinical Behaviour of Synovial Sarcoma: Retrospective Analysis of 174 Patients at a Single Institution », *Cancer Manag Res*, vol. 12, p. 1759-1769, mars 2020, doi: 10.2147/CMAR.S228578.
- [270] W. Barham *et al.*, « Targeting the Wnt Pathway in Synovial Sarcoma Models », *Cancer Discov*, vol. 3, n° 11, p. 10.1158/2159-8290.CD-13-0138, nov. 2013, doi: 10.1158/2159-8290.CD-13-0138.
- [271] R. Li, M. Liu, Z. Yang, J. Li, Y. Gao, et R. Tan, « Proteolysis-Targeting Chimeras (PROTACs) in Cancer Therapy: Present and Future », *Molecules*, vol. 27, n° 24, p. 8828, déc. 2022, doi: 10.3390/molecules27248828.
- [272] S. M. Pollack *et al.*, « T-cell infiltration and clonality correlate with programmed cell death protein 1 and programmed death-ligand 1 expression in patients with soft tissue sarcomas », *Cancer*, vol. 123, n° 17, p. 3291-3304, sept. 2017, doi: 10.1002/cncr.30726.
- [273] R. G. Maki *et al.*, « A Pilot Study of Anti-CTLA4 Antibody Ipilimumab in Patients with Synovial Sarcoma », *Sarcoma*, vol. 2013, p. 168145, 2013, doi: 10.1155/2013/168145.
- [274] H. A. Tawbi *et al.*, « Pembrolizumab in Advanced Soft Tissue and Bone Sarcomas: Results of SARC028, A Multicentre, Single arm, Phase 2 Trial », *Lancet Oncol*, vol. 18, n° 11, p. 1493-1501, nov. 2017, doi: 10.1016/S1470-2045(17)30624-1.
- [275] P. F. Robbins *et al.*, « Tumor Regression in Patients With Metastatic Synovial Cell Sarcoma and Melanoma Using Genetically Engineered Lymphocytes Reactive With NY-ESO-1 », *J Clin Oncol*, vol. 29, n° 7, p. 917-924, mars 2011, doi: 10.1200/JCO.2010.32.2537.
- [276] I. Ramachandran *et al.*, « Systemic and local immunity following adoptive transfer of NY-ESO-1 SPEAR T cells in synovial sarcoma », *J Immunother Cancer*, vol. 7, p. 276, oct. 2019, doi: 10.1186/s40425-019-0762-2.
- [277] D. S. Hong *et al.*, « Phase I dose escalation and expansion trial to assess the safety and efficacy of ADP-A2M4 SPEAR T cells in advanced solid tumors. », *JCO*, vol. 38, n° 15_suppl, p. 102-102, mai 2020, doi: 10.1200/JCO.2020.38.15_suppl.102.
- [278] G. R. Bean *et al.*, « A metabolic synthetic lethal strategy with arginine deprivation and chloroquine leads to cell death in ASS1-deficient sarcomas », *Cell Death Dis*, vol. 7, n° 10, p. e2406, oct. 2016, doi: 10.1038/cddis.2016.232.
- [279] J. C. Kremer *et al.*, « Arginine Deprivation Inhibits the Warburg Effect and Upregulates Glutamine Anaplerosis and Serine Biosynthesis in ASS1-Deficient Cancers », *Cell Rep*, vol. 18, n° 4, p. 991-1004, janv. 2017, doi: 10.1016/j.celrep.2016.12.077.
- [280] S. Yao *et al.*, « Phase 1 trial of ADI-PEG20 plus cisplatin in patients with pretreated metastatic melanoma or other advanced solid malignancies », *Br J Cancer*, vol. 124, n° 9, Art. n° 9, avr. 2021, doi: 10.1038/s41416-020-01230-8.
- [281] A. Annunziato, « DNA Packaging: Nucleosomes and Chromatin », *Nature Education*, vol. 1, n° 26, 2008, Consulté le: 29 avril 2023. [En ligne]. Disponible sur:

<http://www.nature.com/scitable/topicpage/dna-packaging-nucleosomes-and-chromatin-310>

- [282] A. Janssen, S. U. Colmenares, et G. H. Karpen, « Heterochromatin: Guardian of the Genome », *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, vol. 34, n° 1, p. 265-288, oct. 2018, doi: 10.1146/annurev-cellbio-100617-062653.
- [283] K. Luger, A. W. Mäder, R. K. Richmond, D. F. Sargent, et T. J. Richmond, « Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution », *Nature*, vol. 389, n° 6648, Art. n° 6648, sept. 1997, doi: 10.1038/38444.
- [284] T. Kouzarides, « Chromatin Modifications and Their Function », *Cell*, vol. 128, n° 4, p. 693-705, févr. 2007, doi: 10.1016/j.cell.2007.02.005.
- [285] S. G. Shah *et al.*, « HISTome2: a database of histone proteins, modifiers for multiple organisms and epidrugs », *Epigenetics & Chromatin*, vol. 13, n° 1, p. 31, août 2020, doi: 10.1186/s13072-020-00354-8.
- [286] B. E. Bernstein *et al.*, « A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells », *Cell*, vol. 125, n° 2, p. 315-326, avr. 2006, doi: 10.1016/j.cell.2006.02.041.
- [287] T. S. Mikkelsen *et al.*, « Genome-wide maps of chromatin state in pluripotent and lineage-committed cells », *Nature*, vol. 448, n° 7153, p. 553-560, août 2007, doi: 10.1038/nature06008.
- [288] J. Marsolier *et al.*, « H3K27me3 conditions chemotolerance in triple-negative breast cancer », *Nat Genet*, vol. 54, n° 4, p. 459-468, avr. 2022, doi: 10.1038/s41588-022-01047-6.
- [289] D. Kumar, S. Cinghu, A. J. Oldfield, P. Yang, et R. Jothi, « Decoding the function of bivalent chromatin in development and cancer », *Genome Res.*, vol. 31, n° 12, p. 2170-2184, janv. 2021, doi: 10.1101/gr.275736.121.
- [290] O. Je *et al.*, « A stem cell-like chromatin pattern may predispose tumor suppressor genes to DNA hypermethylation and heritable silencing », *Nature genetics*, vol. 39, n° 2, févr. 2007, doi: 10.1038/ng1972.
- [291] M. A. Morgan et A. Shilatifard, « Epigenetic ConFUSION: SS18-SSX Fusion Rewires BAF Complex to Activate Bivalent Genes in Synovial Sarcoma », *Cancer Cell*, vol. 33, n° 6, p. 951-953, juin 2018, doi: 10.1016/j.ccell.2018.05.011.
- [292] M. V. C. Greenberg et D. Bourc'his, « The diverse roles of DNA methylation in mammalian development and disease », *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 20, n° 10, Art. n° 10, oct. 2019, doi: 10.1038/s41580-019-0159-6.
- [293] A. Bird, « DNA methylation patterns and epigenetic memory », *Genes Dev.*, vol. 16, n° 1, p. 6-21, janv. 2002, doi: 10.1101/gad.947102.
- [294] M. Gardiner-Garden et M. Frommer, « CpG Islands in vertebrate genomes », *Journal of Molecular Biology*, vol. 196, n° 2, p. 261-282, juill. 1987, doi: 10.1016/0022-2836(87)90689-9.
- [295] S. Biswas et C. M. Rao, « Epigenetics in cancer: Fundamentals and Beyond », *Pharmacology & Therapeutics*, vol. 173, p. 118-134, mai 2017, doi: 10.1016/j.pharmthera.2017.02.011.
- [296] A. Banito *et al.*, « The SS18-SSX Oncoprotein Hijacks KDM2B-PRC1.1 to Drive Synovial Sarcoma », *Cancer Cell*, vol. 33, n° 3, p. 527-541.e8, mars 2018, doi: 10.1016/j.ccell.2018.01.018.
- [297] S. Kumar, E. A. Gonzalez, P. Rameshwar, et J.-P. Etchegaray, « Non-Coding RNAs as Mediators of Epigenetic Changes in Malignancies », *Cancers (Basel)*, vol. 12, n° 12, p. 3657, déc. 2020, doi: 10.3390/cancers12123657.
- [298] M. Hisaoka *et al.*, « Identification of altered MicroRNA expression patterns in synovial

- sarcoma », *Genes, Chromosomes and Cancer*, vol. 50, n° 3, p. 137-145, 2011, doi: 10.1002/gcc.20837.
- [299] A. L. Sarver, L. Li, et S. Subramanian, « MicroRNA miR-183 Functions as an Oncogene by Targeting the Transcription Factor EGR1 and Promoting Tumor Cell Migration », *Cancer Research*, vol. 70, n° 23, p. 9570-9580, déc. 2010, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-2074.
- [300] Y. Minami *et al.*, « SS18-SSX-regulated miR-17 promotes tumor growth of synovial sarcoma by inhibiting p21WAF1/CIP1 », *Cancer Science*, vol. 105, n° 9, p. 1152-1159, 2014, doi: 10.1111/cas.12479.
- [301] K. Uotani *et al.*, « Circulating MicroRNA-92b-3p as a Novel Biomarker for Monitoring of Synovial Sarcoma », *Sci Rep*, vol. 7, n° 1, Art. n° 1, nov. 2017, doi: 10.1038/s41598-017-12660-5.
- [302] L. Pazzaglia *et al.*, « miR-494.3p expression in synovial sarcoma: Role of CXCR4 as a potential target gene », *International Journal of Oncology*, vol. 54, nov. 2018, doi: 10.3892/ijo.2018.4627.
- [303] B. Schuettengruber, H.-M. Bourbon, L. Di Croce, et G. Cavalli, « Genome Regulation by Polycomb and Trithorax: 70 Years and Counting », *Cell*, vol. 171, n° 1, p. 34-57, sept. 2017, doi: 10.1016/j.cell.2017.08.002.
- [304] N. P. Blackledge et R. J. Klose, « The molecular principles of gene regulation by Polycomb repressive complexes », *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 22, n° 12, Art. n° 12, déc. 2021, doi: 10.1038/s41580-021-00398-y.
- [305] V. van den Boom *et al.*, « Non-canonical PRC1.1 Targets Active Genes Independent of H3K27me3 and Is Essential for Leukemogenesis », *Cell Reports*, vol. 14, n° 2, p. 332-346, janv. 2016, doi: 10.1016/j.celrep.2015.12.034.
- [306] N. Mashtalir *et al.*, « Modular Organization and Assembly of SWI/SNF Family Chromatin Remodeling Complexes », *Cell*, vol. 175, n° 5, p. 1272-1288.e20, nov. 2018, doi: 10.1016/j.cell.2018.09.032.
- [307] J. Li *et al.*, « A Role for SMARCB1 in Synovial Sarcomagenesis Reveals That SS18–SSX Induces Canonical BAF Destruction », *Cancer Discovery*, vol. 11, n° 10, p. 2620-2637, oct. 2021, doi: 10.1158/2159-8290.CD-20-1219.
- [308] C. R. Clapier, J. Iwasa, B. R. Cairns, et C. L. Peterson, « Mechanisms of action and regulation of ATP-dependent chromatin-remodelling complexes », *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 18, n° 7, p. 407-422, juill. 2017, doi: 10.1038/nrm.2017.26.
- [309] C. Kadoch et G. R. Crabtree, « Mammalian SWI/SNF chromatin remodeling complexes and cancer: Mechanistic insights gained from human genomics », *Sci. Adv.*, vol. 1, n° 5, p. e1500447, juin 2015, doi: 10.1126/sciadv.1500447.
- [310] H. Rafati, M. Parra, S. Hakre, Y. Moshkin, E. Verdin, et T. Mahmoudi, « Repressive LTR nucleosome positioning by the BAF complex is required for HIV latency », *PLoS Biol*, vol. 9, n° 11, p. e1001206, nov. 2011, doi: 10.1371/journal.pbio.1001206.
- [311] C. Kadoch *et al.*, « Dynamics of BAF–Polycomb complex opposition on heterochromatin in normal and oncogenic states », *Nat Genet*, vol. 49, n° 2, Art. n° 2, févr. 2017, doi: 10.1038/ng.3734.
- [312] D. R. H. Bruijn *et al.*, « Isolation and characterization of the mouse homolog of SYT, a gene implicated in the development of human synovial sarcomas », *Oncogene*, vol. 13, p. 643-8, sept. 1996.
- [313] J. Clark *et al.*, « Identification of novel genes, SYT and SSX, involved in the t(X;18)(p11.2;q11.2) translocation found in human synovial sarcoma », *Nat Genet*, vol. 7, n° 4, p. 502-508, août 1994, doi: 10.1038/ng0894-502.

- [314] N. R. Dos Santos, D. R. H. De Bruijn, E. Kater-Baats, A. P. Otte, et A. G. Van Kessel, « Delineation of the Protein Domains Responsible for SYT, SSX, and SYT-SSX Nuclear Localization », *Experimental Cell Research*, vol. 256, n° 1, p. 192-202, avr. 2000, doi: 10.1006/excr.2000.4813.
- [315] E. Tamborini *et al.*, « Identification of a novel spliced variant of the SYT gene expressed in normal tissues and in synovial sarcoma », *Br J Cancer*, vol. 84, n° 8, p. 1087-1094, avr. 2001, doi: 10.1054/bjoc.2000.1710.
- [316] D. Brett, S. Wood, P. Antonson, J. Shipley, C. Cooper, et G. Goodwin, « The SYT protein involved in the t(X;18) synovial sarcoma translocation is a transcriptional activator localised in nuclear bodies », *Human molecular genetics*, vol. 6, p. 1559-64, oct. 1997.
- [317] T. H. Rabbitts, « Chromosomal translocations in human cancer », *Nature*, vol. 372, n° 6502, Art. n° 6502, nov. 1994, doi: 10.1038/372143a0.
- [318] C. Thaete *et al.*, « Functional Domains of the SYT and SYT-SSX Synovial Sarcoma Translocation Proteins and Co-Localization with the SNF Protein BRM in the Nucleus », *Human molecular genetics*, vol. 8, p. 585-91, mai 1999, doi: 10.1093/hmg/8.4.585.
- [319] H. Kato *et al.*, « SYT Associates with Human SNF/SWI Complexes and the C-terminal Region of Its Fusion Partner SSX1 Targets Histones* », *Journal of Biological Chemistry*, vol. 277, n° 7, p. 5498-5505, févr. 2002, doi: 10.1074/jbc.M108702200.
- [320] E. Middeljans, X. Wan, P. W. Jansen, V. Sharma, H. G. Stunnenberg, et C. Logie, « SS18 Together with Animal-Specific Factors Defines Human BAF-Type SWI/SNF Complexes », *PLOS ONE*, vol. 7, n° 3, p. e33834, mars 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0033834.
- [321] M. Perani, C. J. Ingram, C. S. Cooper, M. D. Garrett, et G. H. Goodwin, « Conserved SNH domain of the proto-oncoprotein SYT interacts with components of the human chromatin remodelling complexes, while the QPGY repeat domain forms homo-oligomers », *Oncogene*, vol. 22, n° 50, Art. n° 50, nov. 2003, doi: 10.1038/sj.onc.1207031.
- [322] D. R. de Bruijn *et al.*, « The synovial sarcoma associated protein SYT interacts with the acute leukemia associated protein AF10 », *Oncogene*, vol. 20, n° 25, p. 3281-3289, mai 2001, doi: 10.1038/sj.onc.1204419.
- [323] S. Debernardi *et al.*, « The MLL fusion partner AF10 binds GAS41, a protein that interacts with the human SWI/SNF complex », *Blood*, vol. 99, n° 1, p. 275-281, janv. 2002, doi: 10.1182/blood.V99.1.275.
- [324] Y. Okada *et al.*, « hDOT1L Links Histone Methylation to Leukemogenesis », *Cell*, vol. 121, n° 2, p. 167-178, avr. 2005, doi: 10.1016/j.cell.2005.02.020.
- [325] N. Shiama, « The p300/CBP family: integrating signals with transcription factors and chromatin », *Trends Cell Biol*, vol. 7, n° 6, p. 230-236, juin 1997, doi: 10.1016/S0962-8924(97)01048-9.
- [326] J. E. Eid, A. L. Kung, R. Scully, et D. M. Livingston, « p300 Interacts with the Nuclear Proto-Oncoprotein SYT as Part of the Active Control of Cell Adhesion », *Cell*, vol. 102, n° 6, p. 839-848, sept. 2000, doi: 10.1016/S0092-8674(00)00072-6.
- [327] M. Perani *et al.*, « The Proto-oncoprotein SYT Interacts with SYT-interacting Protein/Co-activator Activator (SIP/CoAA), a Human Nuclear Receptor Co-activator with Similarity to EWS and TLS/FUS Family of Proteins* », *Journal of Biological Chemistry*, vol. 280, n° 52, p. 42863-42876, déc. 2005, doi: 10.1074/jbc.M502963200.
- [328] Z.-Q. Huang, J. Li, L. M. Sachs, P. A. Cole, et J. Wong, « A role for cofactor–cofactor and cofactor–histone interactions in targeting p300, SWI/SNF and Mediator for transcription », *EMBO J*, vol. 22, n° 9, p. 2146-2155, mai 2003, doi: 10.1093/emboj/cdg219.
- [329] Y. Cheng *et al.*, « Phase transition and remodeling complex assembly are important for

SS18-SSX oncogenic activity in synovial sarcomas », *Nat Commun*, vol. 13, p. 2724, mai 2022, doi: 10.1038/s41467-022-30447-9.

[330] X. Tong *et al.*, « Liquid–liquid phase separation in tumor biology », *Sig Transduct Target Ther*, vol. 7, n° 1, Art. n° 1, juill. 2022, doi: 10.1038/s41392-022-01076-x.

[331] T. Ito *et al.*, « SYT, a partner of SYT-SSX oncoprotein in synovial sarcomas, interacts with mSin3A, a component of histone deacetylase complex », *Lab Invest*, vol. 84, n° 11, p. 1484-1490, nov. 2004, doi: 10.1038/labinvest.3700174.

[332] H. A. Smith et D. G. McNeel, « The SSX Family of Cancer-Testis Antigens as Target Proteins for Tumor Therapy », *Clin Dev Immunol*, vol. 2010, p. 150591, 2010, doi: 10.1155/2010/150591.

[333] G. Cronwright, K. Le Blanc, C. Götherström, P. Darcy, M. Ehnman, et B. Brodin, « Cancer/Testis Antigen Expression in Human Mesenchymal Stem Cells: Down-regulation of SSX Impairs Cell Migration and Matrix Metalloproteinase 2 Expression », *Cancer Research*, vol. 65, n° 6, p. 2207-2215, mars 2005, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-1882.

[334] Ö. Türeci *et al.*, « Expression of SSX genes in human tumors », *International Journal of Cancer*, vol. 77, n° 1, p. 19-23, 1998, doi: 10.1002/(SICI)1097-0215(19980703)77:1<19::AID-IJC4>3.0.CO;2-2.

[335] J. F. Margolin, J. R. Friedman, W. K. Meyer, H. Vissing, H. J. Thiesen, et F. J. Rauscher, « Krüppel-associated boxes are potent transcriptional repression domains. », *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 91, n° 10, p. 4509-4513, mai 1994.

[336] G. Pengue, V. Calabro, P. C. Bartoli, A. Pagliuca, et L. Lania, « Repression of transcriptional activity at a distance by the evolutionarily conserved KRAB domain present in a subfamily of zinc finger proteins ».

[337] N. R. dos Santos, D. R. H. de Bruijn, et A. G. van Kessel, « Molecular mechanisms underlying human synovial sarcoma development », *Genes, Chromosomes and Cancer*, vol. 30, n° 1, p. 1-14, 2001, doi: 10.1002/1098-2264(2000)9999:9999<::AID-GCC1056>3.0.CO;2-G.

[338] F. L. Lim, M. Soulez, D. Koczan, H.-J. Thiesen, et J. C. Knight, « A KRAB-related domain and a novel transcription repression domain in proteins encoded by SSX genes that are disrupted in human sarcomas », *Oncogene*, vol. 17, n° 15, Art. n° 15, oct. 1998, doi: 10.1038/sj.onc.1202122.

[339] M. F. Gjerstorff *et al.*, « SSX2 is a novel DNA-binding protein that antagonizes polycomb group body formation and gene repression », *Nucleic Acids Research*, vol. 42, n° 18, p. 11433-11446, oct. 2014, doi: 10.1093/nar/gku852.

[340] S. Traynor *et al.*, « Remodeling and destabilization of chromosome 1 pericentromeric heterochromatin by SSX proteins », *Nucleic Acids Research*, vol. 47, n° 13, p. 6668-6684, juill. 2019, doi: 10.1093/nar/gkz396.

[341] M. Soulez, A. J. Saurin, P. S. Freemont, et J. C. Knight, « SSX and the synovial-sarcoma-specific chimaeric protein SYT-SSX co-localize with the human Polycomb group complex », *Oncogene*, vol. 18, n° 17, Art. n° 17, avr. 1999, doi: 10.1038/sj.onc.1202613.

[342] V. Pirrotta et H.-B. Li, « A view of nuclear Polycomb bodies », *Curr Opin Genet Dev*, vol. 22, n° 2, p. 101-109, avr. 2012, doi: 10.1016/j.gde.2011.11.004.

[343] D. R. H. de Bruijn, A. H. A. van Dijk, M. P. Willemse, et A. G. van Kessel, « The C terminus of the synovial sarcoma-associated SSX proteins interacts with the LIM homeobox protein LHX4 », *Oncogene*, vol. 27, n° 5, Art. n° 5, janv. 2008, doi: 10.1038/sj.onc.1210688.

[344] N. Kawamata, S. Sakajiri, K. Sugimoto, Y. Isobe, H. Kobayashi, et K. Oshimi, « A novel chromosomal translocation t(1;14)(q25;q32) in pre-B acute lymphoblastic leukemia involves the LIM homeodomain protein gene, Lhx4 », *Oncogene*, vol. 21, n° 32, Art. n° 32, juill. 2002,

doi: 10.1038/sj.onc.1205628.

[345] Y. Wei *et al.*, « Characteristic sequence motifs located at the genomic breakpoints of the translocation t(X;18) in synovial sarcomas », *Oncogene*, vol. 22, n° 14, Art. n° 14, avr. 2003, doi: 10.1038/sj.onc.1206343.

[346] A. J. Crew *et al.*, « Fusion of SYT to two genes, SSX1 and SSX2, encoding proteins with homology to the Kruppel-associated box in human synovial sarcoma », *EMBO J*, vol. 14, n° 10, p. 2333-2340, mai 1995, doi: 10.1002/j.1460-2075.1995.tb07228.x.

[347] B. de Leeuw, M. Balemans, D. Olde Weghuis, et A. Geurts van Kessel, « Identification of two alternative fusion genes, SYT-SSX1 and SYT-SSX2, in t(X;18)(p11.2;q11.2)-positive synovial sarcomas », *Hum Mol Genet*, vol. 4, n° 6, p. 1097-1099, juin 1995, doi: 10.1093/hmg/4.6.1097.

[348] B. Skytting *et al.*, « A novel fusion gene, SYT-SSX4, in synovial sarcoma », *J Natl Cancer Inst*, vol. 91, n° 11, p. 974-975, juin 1999, doi: 10.1093/jnci/91.11.974.

[349] J. Przybyl *et al.*, « Recurrent and novel SS18-SSX fusion transcripts in synovial sarcoma: description of three new cases », *Tumour Biol*, vol. 33, n° 6, p. 2245-2253, sept. 2012, doi: 10.1007/s13277-012-0486-0.

[350] C. Kadoch et G. R. Crabtree, « Reversible Disruption of mSWI/SNF (BAF) Complexes by the SS18-SSX Oncogenic Fusion in Synovial Sarcoma », *Cell*, vol. 153, n° 1, p. 71-85, mars 2013, doi: 10.1016/j.cell.2013.02.036.

[351] I. Panagopoulos *et al.*, « Clinical impact of molecular and cytogenetic findings in synovial sarcoma », *Genes, Chromosomes and Cancer*, vol. 31, n° 4, p. 362-372, 2001, doi: 10.1002/gcc.1155.

[352] P. Lagarde *et al.*, « Chromosome Instability Accounts for Reverse Metastatic Outcomes of Pediatric and Adult Synovial Sarcomas », *Journal of Clinical Oncology*, janv. 2013, doi: 10.1200/JCO.2012.46.0147.

[353] C. G. Joseph *et al.*, « Exomic Analysis of Myxoid Liposarcomas, Synovial Sarcomas, and Osteosarcomas », *Genes Chromosomes Cancer*, vol. 53, n° 1, p. 15-24, janv. 2014, doi: 10.1002/gcc.22114.

[354] M. J. McBride *et al.*, « The SS18-SSX Fusion Oncoprotein Hijacks BAF Complex Targeting and Function to Drive Synovial Sarcoma », *Cancer Cell*, vol. 33, n° 6, p. 1128-1141.e7, juin 2018, doi: 10.1016/j.ccell.2018.05.002.

[355] J. Przybyl *et al.*, « Metastatic potential is determined early in synovial sarcoma development and reflected by tumor molecular features », *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, vol. 53, p. 505-513, août 2014, doi: 10.1016/j.biocel.2014.05.006.

[356] M. Nagai *et al.*, « Analysis of transforming activity of human synovial sarcoma-associated chimeric protein SYT-SSX1 bound to chromatin remodeling factor hBRM/hSNF2 α », *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 98, n° 7, p. 3843-3848, mars 2001, doi: 10.1073/pnas.061036798.

[357] M. Haldar, J. D. Hancock, C. M. Coffin, S. L. Lessnick, et M. R. Capecchi, « A Conditional Mouse Model of Synovial Sarcoma: Insights into a Myogenic Origin », *Cancer Cell*, vol. 11, n° 4, p. 375-388, avr. 2007, doi: 10.1016/j.ccr.2007.01.016.

[358] E. E. Carmody Soni, S. Schlottman, H. V. Erkizan, A. Uren, et J. A. Toretsky, « Loss of SS18-SSX1 Inhibits Viability and Induces Apoptosis in Synovial Sarcoma », *Clin Orthop Relat Res*, vol. 472, n° 3, p. 874-882, mars 2014, doi: 10.1007/s11999-013-3065-9.

[359] C. Peng, W. Guo, Y. Yang, et H. Zhao, « Downregulation of SS18-SSX1 expression by small interfering RNA inhibits growth and induces apoptosis in human synovial sarcoma cell line HS-SY-II in vitro », *Eur J Cancer Prev*, vol. 17, n° 5, p. 392-398, oct. 2008, doi:

10.1097/CEJ.0b013e328305a11b.

[360] M. Ishida *et al.*, « The SYT-SSX Fusion Protein Down-Regulates the Cell Proliferation Regulator COM1 in t(x;18) Synovial Sarcoma », *Mol Cell Biol*, vol. 27, n° 4, p. 1348-1355, févr. 2007, doi: 10.1128/MCB.00658-06.

[361] C. B. Garcia, C. M. Shaffer, et J. E. Eid, « Genome-wide recruitment to Polycomb-modified chromatin and activity regulation of the synovial sarcoma oncogene SYT-SSX2 », *BMC Genomics*, vol. 13, n° 1, p. 189, mai 2012, doi: 10.1186/1471-2164-13-189.

[362] T. Saito, M. Nagai, et M. Ladanyi, « SYT-SSX1 and SYT-SSX2 Interfere with Repression of E-Cadherin by Snail and Slug: A Potential Mechanism for Aberrant Mesenchymal to Epithelial Transition in Human Synovial Sarcoma », *Cancer Res*, vol. 66, n° 14, p. 6919-6927, juill. 2006, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-3697.

[363] L. Su *et al.*, « Deconstruction of the SS18-SSX Fusion Oncoprotein Complex: Insights into Disease Etiology and Therapeutics », *Cancer Cell*, vol. 21, n° 3, p. 333-347, mars 2012, doi: 10.1016/j.ccr.2012.01.010.

[364] B. Brodin *et al.*, « Cloning and characterization of spliced fusion transcript variants of synovial sarcoma: SYT/SSX4, SYT/SSX4v, and SYT/SSX2v. Possible regulatory role of the fusion gene product in wild type SYT expression », *Gene*, vol. 268, n° 1, p. 173-182, mai 2001, doi: 10.1016/S0378-1119(01)00412-7.

[365] G. L. Brien *et al.*, « Targeted degradation of BRD9 reverses oncogenic gene expression in synovial sarcoma », *eLife*, vol. 7, p. e41305, nov. 2018, doi: 10.7554/eLife.41305.

[366] K. B. Jones *et al.*, « The impact of chromosomal translocation locus and fusion oncogene coding sequence in synovial sarcomagenesis », *Oncogene*, vol. 35, n° 38, p. 5021-5032, sept. 2016, doi: 10.1038/onc.2016.38.

[367] Z. Geng et Z. Gao, « Mammalian PRC1 Complexes: Compositional Complexity and Diverse Molecular Mechanisms », *Int J Mol Sci*, vol. 21, n° 22, p. 8594, nov. 2020, doi: 10.3390/ijms21228594.

[368] G. Boulay *et al.*, « The chromatin landscape of primary synovial sarcoma organoids is linked to specific epigenetic mechanisms and dependencies », *Life Sci Alliance*, vol. 4, n° 2, p. e202000808, déc. 2020, doi: 10.26508/lsa.202000808.

[369] M. Haldar, M. L. Hedberg, M. F. Hockin, et M. R. Capecchi, « A CreER based random induction strategy for modeling translocation-associated sarcomas in mice », *Cancer Res*, vol. 69, n° 8, p. 3657-3664, avr. 2009, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-4127.

[370] L. Cironi *et al.*, « The fusion protein SS18-SSX1 employs core Wnt pathway transcription factors to induce a partial Wnt signature in synovial sarcoma », *Sci Rep*, vol. 6, n° 1, p. 22113, avr. 2016, doi: 10.1038/srep22113.

[371] N. Naka *et al.*, « Synovial Sarcoma Is a Stem Cell Malignancy », *STEM CELLS*, vol. 28, n° 7, p. 1119-1131, 2010, doi: 10.1002/stem.452.

[372] L. Cironi *et al.*, « Epigenetic Features of Human Mesenchymal Stem Cells Determine Their Permissiveness for Induction of Relevant Transcriptional Changes by SYT-SSX1 », *PLoS One*, vol. 4, n° 11, p. e7904, nov. 2009, doi: 10.1371/journal.pone.0007904.

[373] T. Shibue et R. A. Weinberg, « EMT, CSCs, and drug resistance: the mechanistic link and clinical implications », *Nat Rev Clin Oncol*, vol. 14, n° 10, p. 611-629, oct. 2017, doi: 10.1038/nrclinonc.2017.44.

[374] M. Castets et P. Mehlen, « Netrin-1 role in angiogenesis: to be or not to be a pro-angiogenic factor? », *Cell Cycle*, vol. 9, n° 8, p. 1466-1471, avr. 2010, doi: 10.4161/cc.9.8.11197.

[375] S. Renders *et al.*, « Niche derived netrin-1 regulates hematopoietic stem cell dormancy

via its receptor neogenin-1 », *Nat Commun*, vol. 12, p. 608, janv. 2021, doi: 10.1038/s41467-020-20801-0.

[376] A. Paradisi *et al.*, « Combining chemotherapeutic agents and netrin-1 interference potentiates cancer cell death », *EMBO Molecular Medicine*, vol. 5, n° 12, p. 1821-1834, déc. 2013, doi: 10.1002/emmm.201302654.

[377] E. Marangoni *et al.*, « CD44 targeting reduces tumour growth and prevents post-chemotherapy relapse of human breast cancers xenografts », *Br. J. Cancer*, vol. 100, n° 6, p. 918-922, mars 2009, doi: 10.1038/sj.bjc.6604953.

[378] C. L. Chaffer *et al.*, « Poised chromatin at the ZEB1 promoter enables cell plasticity and enhances tumorigenicity », *Cell*, vol. 154, n° 1, p. 61-74, juill. 2013, doi: 10.1016/j.cell.2013.06.005.

[379] S. A. Mani *et al.*, « The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells », *Cell*, vol. 133, n° 4, p. 704-715, mai 2008, doi: 10.1016/j.cell.2008.03.027.

[380] A. Latifi *et al.*, « Cisplatin treatment of primary and metastatic epithelial ovarian carcinomas generates residual cells with mesenchymal stem cell-like profile », *Journal of Cellular Biochemistry*, vol. 112, n° 10, p. 2850-2864, 2011, doi: 10.1002/jcb.23199.

[381] J. H. Taube *et al.*, « Core epithelial-to-mesenchymal transition interactome gene-expression signature is associated with claudin-low and metaplastic breast cancer subtypes », *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 107, n° 35, p. 15449-15454, août 2010, doi: 10.1073/pnas.1004900107.

[382] E. Marangoni *et al.*, « CD44 targeting reduces tumour growth and prevents post-chemotherapy relapse of human breast cancers xenografts », *Br J Cancer*, vol. 100, n° 6, p. 918-922, mars 2009, doi: 10.1038/sj.bjc.6604953.

[383] A. Fantozzi et G. Christofori, « Mouse models of breast cancer metastasis », *Breast Cancer Res*, vol. 8, n° 4, p. 212, 2006, doi: 10.1186/bcr1530.

[384] C. A. Arciero et T. M. Styblo, « Clinically Established Prognostic Factors in Breast Cancer », in *The Breast (Fifth Edition)*, K. I. Bland, E. M. Copeland, V. S. Klimberg, et W. J. Gradishar, Éd., Elsevier, 2018, p. 250-257.e3. doi: 10.1016/B978-0-323-35955-9.00018-0.

[385] S. Halabi et K. Owzar, « The Importance of Identifying and Validating Prognostic Factors in Oncology », *Semin Oncol*, vol. 37, n° 2, p. e9-18, avr. 2010, doi: 10.1053/j.seminoncol.2010.04.001.

[386] M. Cianfrocca et L. J. Goldstein, « Prognostic and Predictive Factors in Early-Stage Breast Cancer », *The Oncologist*, vol. 9, n° 6, p. 606-616, nov. 2004, doi: 10.1634/theoncologist.9-6-606.

[387] G. M. Clark, « Do we really need prognostic factors for breast cancer? », *Breast Cancer Res Tr*, vol. 30, n° 2, p. 117-126, janv. 1994, doi: 10.1007/BF00666054.

[388] E. Orrantia-Borunda, P. Anchondo-Nuñez, L. E. Acuña-Aguilar, F. O. Gómez-Valles, et C. A. Ramírez-Valdespino, « Subtypes of Breast Cancer », in *Breast Cancer*, H. N. Mayrovitz, Éd., Brisbane (AU): Exon Publications, 2022. Consulté le: 2 juin 2023. [En ligne]. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK583808/>

[389] S. Lheureux, M. Braunstein, et A. M. Oza, « Epithelial ovarian cancer: Evolution of management in the era of precision medicine », *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, vol. 69, n° 4, p. 280-304, 2019, doi: 10.3322/caac.21559.

[390] L. Walcher *et al.*, « Cancer Stem Cells—Origins and Biomarkers: Perspectives for Targeted Personalized Therapies », *Front Immunol*, vol. 11, p. 1280, août 2020, doi: 10.3389/fimmu.2020.01280.

- [391] E. Hattori, R. Oyama, et T. Kondo, « Systematic Review of the Current Status of Human Sarcoma Cell Lines », *Cells*, vol. 8, n° 2, p. 157, févr. 2019, doi: 10.3390/cells8020157.
- [392] M. Trautmann *et al.*, « SS18-SSX fusion protein-induced Wnt/ β -catenin signaling is a therapeutic target in synovial sarcoma », *Oncogene*, vol. 33, n° 42, Art. n° 42, oct. 2014, doi: 10.1038/onc.2013.443.
- [393] W. Bao *et al.*, « Molecular Cytogenetic Characterization of Synovial Sarcoma Cell Line SW982 », *NACS*, vol. 6, n° 3, p. 606-613, sept. 2021.
- [394] K. Mamchaoui *et al.*, « Immortalized pathological human myoblasts: towards a universal tool for the study of neuromuscular disorders », *Skeletal Muscle*, vol. 1, n° 1, p. 34, déc. 2011, doi: 10.1186/2044-5040-1-34.
- [395] N. Eastley *et al.*, « Telomere maintenance in soft tissue sarcomas », *J Clin Pathol*, vol. 70, n° 5, p. 371-377, mai 2017, doi: 10.1136/jclinpath-2016-204151.
- [396] C. M. Heaphy *et al.*, « Prevalence of the Alternative Lengthening of Telomeres Telomere Maintenance Mechanism in Human Cancer Subtypes », *Am J Pathol*, vol. 179, n° 4, p. 1608-1615, oct. 2011, doi: 10.1016/j.ajpath.2011.06.018.
- [397] Y. Oda, A. Sakamoto, T. Satio, S. Kawauchi, Y. Iwamoto, et M. Tsuneyoshi, « Molecular abnormalities of p53, MDM2, and H-ras in synovial sarcoma », *Mod Pathol*, vol. 13, n° 9, p. 994-1004, sept. 2000, doi: 10.1038/modpathol.3880180.
- [398] R. Nusse et H. Clevers, « Wnt/ β -Catenin Signaling, Disease, and Emerging Therapeutic Modalities », *Cell*, vol. 169, n° 6, p. 985-999, juin 2017, doi: 10.1016/j.cell.2017.05.016.
- [399] A. E. Horvai, M. J. Kramer, et R. O'Donnell, « β -Catenin Nuclear Expression Correlates With Cyclin D1 Expression in Primary and Metastatic Synovial Sarcoma: A Tissue Microarray Study », *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, vol. 130, n° 6, p. 792-798, juin 2006, doi: 10.5858/2006-130-792-CNECWC.
- [400] I. Isfort *et al.*, « Interdependence of SS18-SSX-driven YAP1 and β -Catenin Activation in Synovial Sarcoma », *Molecular Cancer Research*, p. OF1-OF13, avr. 2023, doi: 10.1158/1541-7786.MCR-22-0588.
- [401] I. Isfort *et al.*, « SS18-SSX-Dependent YAP/TAZ Signaling in Synovial Sarcoma », *Clin Cancer Res*, vol. 25, n° 12, p. 3718-3731, juin 2019, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-17-3553.
- [402] T. S. K. Eisinger-Mathason *et al.*, « Deregulation of the Hippo pathway in soft-tissue sarcoma promotes FOXM1 expression and tumorigenesis », *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 112, n° 26, p. E3402-E3411, juin 2015, doi: 10.1073/pnas.1420005112.
- [403] A. Kyriazoglou et P. Bagos, « Meta-analysis of BCOR rearranged sarcomas: challenging the therapeutic approach », *Acta Oncologica*, vol. 60, n° 6, p. 721-726, juin 2021, doi: 10.1080/0284186X.2021.1890818.
- [404] K. C. Genadry, S. Pietrobono, R. Rota, et C. M. Linardic, « Soft Tissue Sarcoma Cancer Stem Cells: An Overview », *Front Oncol*, vol. 8, p. 475, oct. 2018, doi: 10.3389/fonc.2018.00475.
- [405] K. B. Jones *et al.*, « Of Mice and Men: Opportunities to Use Genetically Engineered Mouse Models of Synovial Sarcoma for Preclinical Cancer Therapeutic Evaluation », *Cancer Control*, vol. 18, p. 148-205, juill. 2011.
- [406] L. Landuzzi, F. Ruzzi, P.-L. Lollini, et K. Scotlandi, « Synovial Sarcoma Preclinical Modeling: Integrating Transgenic Mouse Models and Patient-Derived Models for Translational Research », *Cancers*, vol. 15, n° 3, Art. n° 3, janv. 2023, doi: 10.3390/cancers15030588.
- [407] P. Mehlen, C. Delloye-Bourgeois, et A. Chédotal, « Novel roles for Slits and netrins: axon guidance cues as anticancer targets? », *Nat Rev Cancer*, vol. 11, n° 3, Art. n° 3, mars 2011,

doi: 10.1038/nrc3005.

[408] M. Di Mattia *et al.*, « Insight into Hypoxia Stemness Control », *Cells*, vol. 10, n° 8, p. 2161, août 2021, doi: 10.3390/cells10082161.

[409] T. Liu *et al.*, « OCT4 Expression and Vasculogenic Mimicry Formation Positively Correlate with Poor Prognosis in Human Breast Cancer », *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 15, n° 11, Art. n° 11, nov. 2014, doi: 10.3390/ijms151119634.

SERMENT DU DOCTEUR

« En présence de mes pairs. Parvenue à l'issue de mon doctorat en Biologie Cellulaire et Moléculaire, et ayant ainsi pratiqué, dans ma quête du savoir, l'exercice d'une recherche scientifique exigeante, en cultivant la rigueur intellectuelle, la réflexivité éthique et dans le respect des principes de l'intégrité scientifique, je m'engage, pour ce qui dépendra de moi, dans la suite de ma carrière professionnelle quel qu'en soit le secteur ou le domaine d'activité, à maintenir une conduite intègre dans mon rapport au savoir, mes méthodes et mes résultats.»

.....

« In the presence of my peers. With the completion of my doctorate in Molecular and Cellular Biology, in my quest for knowledge, I have carried out demanding research, demonstrated intellectual rigour, ethical reflection, and respect for the principles of research integrity. As I pursue my professional career, whatever my chosen field, I pledge, to the greatest of my ability, to continue to maintain integrity in my relationship to knowledge, in my methods and in my results. »

Résumé

Appartenant à la famille des laminines, nétrine-1 est une petite molécule sécrétée à laquelle un large éventail de fonctions est maintenant décrit. Protéine du développement, nétrine-1 n'est que peu, voire pas, exprimée dans les tissus adultes sains. En revanche, dans des contextes pathologiques comme par exemple les cancers, une réexpression de la protéine est décrite, impliquant alors l'activation des voies de signalisation associées et entraînant différents processus comme la survie cellulaire, l'angiogenèse, l'inflammation.

Les recherches présentées dans ce manuscrit ont mis en évidence un rôle de nétrine-1 dans la plasticité cellulaire, mécanisme essentiel au développement tumoral et représentant un véritable challenge thérapeutique compte-tenu des propriétés d'auto-renouvellement, de migration cellulaire mais également de résistance aux thérapies qui lui sont associées.

Ainsi, à travers l'étude des exemples des cellules souches cancéreuses mammaires et ovariennes ainsi que l'étude des synoviosarcomes, ce manuscrit décrit le rôle critique de nétrine-1 dans la plasticité cellulaire et comment un anticorps thérapeutique monoclonal dirigé contre cette protéine représente une stratégie thérapeutique prometteuse.

Abstract

Belonging to the laminin family, netrin-1 is a small secreted molecule with a wide range of functions now described. As a developmental protein, netrin-1 is minimally or not expressed in healthy adult tissues. However, in pathological contexts such as cancer, a re-expression of the protein is observed, involving the activation of associated signaling pathways and leading to various processes such as cell survival, angiogenesis, and inflammation.

The research presented in this manuscript has highlighted the role of netrin-1 in cellular plasticity, a crucial mechanism in tumor development and a significant therapeutic challenge due to its properties of self-renewal, cell migration, and therapy resistance.

Through the study of examples in breast and ovarian cancer stem cells, as well as synovial sarcomas, this manuscript describes the critical role of netrin-1 in cellular plasticity and how a monoclonal therapeutic antibody targeting this protein represents a promising therapeutic strategy.